

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GLAUCO SILVA DIAS

AUMENTO DE ESCALA DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS EM  
REATORES DE LEITO FIXO COM SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia*  
*lata* CPQBA 515-12 DRM 01

CURITIBA  
2015

GLAUCO SILVA DIAS

AUMENTO DE ESCALA DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS EM  
REATORES DE LEITO FIXO COM SÓLIDO FERMENTADO POR *Burkholderia*  
*lata* CPQBA 515-12 DRM 01

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nadia Krieger

CURITIBA  
2015

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Dias, Glauco Silva

Aumento de escala da produção de ésteres etílicos em reatores de leito fixo com sólido fermentado por *Burkholderia lata* CPQBA 515-12 DRM 01. / Glauco Silva Dias. – Curitiba, 2015.  
128f.: il. ; 30cm.

Orientador: David Alexander Mitchell

Coorientadora: Nadia Krieger

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Lipase. 2. Biodiesel. 3. Fermentação. I. Título II. Mitchell, David Alexander. III. Krieger, Nadia. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

## TERMO DE APROVAÇÃO

GLAUCO SILVA DIAS

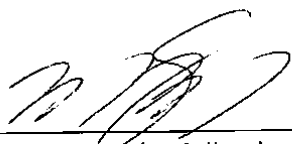
Aumento de escala da produção de ésteres etílicos em reatores de leito fixo  
com sólido fermentado por *Burkholderia lata* CPQBA 512-12 DRM01

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



---

Prof. Dr. David Alexander Mitchell – Orientador  
Departamento de Bioquímica, UFPR



---

Prof. Dr. Marcelo Muller dos Santos  
Departamento de Bioquímica, UFPR



---

Prof. Dr. Fernando Voll  
Departamento de Eng. Química, UFPR

Curitiba, 30 de março de 2015.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser fiel e sempre me apontar os melhores caminhos;

À minha família baiana: Meus pais, Edson Dias e Maria Nilva Dias. A Ele, por ser meu maior exemplo de honestidade e pelo investimento em minha educação. A Ela, por ser o meu porto seguro, pelos sacrifícios e renúncias e, principalmente, por confiar em minha capacidade. A ambos, por serem o melhor pai e a melhor mãe; e Igor Dias, por ser simplesmente o meu irmão. Pela bondade e caráter que são, para mim, exemplos vitalícios;

À minha família paranaense: Babazinha, por ter me acolhido em Curitiba e, por várias vezes, exercer papel de mãe; Gislaine por ser a irmã que eu não tive, pelas horas de conversa, pela cumplicidade e, principalmente, pela alegria que me causa somente pelo fato de estar perto e Wilian, pelo companheirismo, compreensão, dedicação e por todo o amor a mim dispensado;

Aos meus orientadores: Prof. Dr. David A. Mitchell e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nadia Krieger, pela oportunidade do mestrado, pela confiança, apoio, ideias e estímulo. Por tudo que aprendi e ainda vou aprender, sou muito grato a vocês;

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Junior do Departamento de Engenharia Química da UFPR, pelas valiosas contribuições em todo o trabalho;

A todos os colegas do LTEB, LTEF e do Laboratório de Biotecnologia do NPDEAS, pelas sugestões e momentos de descontração;

Aos colegas de turma do mestrado, pela força inicial, principalmente à Janinha, Wilinha e Vanessinha por terem se tornado amigos, rompendo os muros da universidade;

À UFPR e ao PPGBq pela oportunidade, sobretudo aos professores, pelo conhecimento transmitido, principalmente à Profa. Dra. Joana Lea Meira Silveira, pelo esplêndido estágio em docência que jamais irei esquecer;

Aos professores Dr. Fernando Voll e Dr. Marcelo Muller, por gentilmente terem aceitado o convite para participação da banca examinadora da dissertação e pela pertinência e qualidade de suas contribuições ao texto;

À CAPES e ao CNPq. pelo auxílio financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente fizeram parte deste momento especial da minha vida, sou imensamente grato. Muito obrigado!

Amei a sabedoria mais do que a saúde e a beleza, e resolvi tê-la como luz, porque o brilho dela nunca se apaga.

Sabedoria 7,10

## RESUMO

Os ésteres alquílicos do biodiesel são produzidos na indústria geralmente por transesterificação alcalina homogênea de triacilgliceróis provenientes de óleos vegetais com metanol. Este processo necessita de etapas de purificação do biodiesel para remoção do catalisador e do sal formado, de tratamento dos efluentes alcalinos gerados e ainda da recuperação do subproduto glicerol. Além disso, matérias-primas neutras e com baixo teor de água são requeridas, o que contribui para elevar o custo de produção do biodiesel. Uma das alternativas para contornar os problemas associados à catálise química é a utilização do processo enzimático com lipases, que podem catalisar reações de esterificação e de transesterificação e dispensam o uso de matérias-primas purificadas. Recentemente, no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da Universidade Federal do Paraná, foi desenvolvido um processo com o intuito de reduzir os custos da produção enzimática do biodiesel. Este processo se consistiu na utilização de um sólido fermentado por *Burkholderia lata* (SFBL) para catalisar a esterificação etílica de ácidos graxos da borra de soja. O processo foi desenvolvido em escala laboratorial, com a utilização de biorreator de leito fixo contendo 12 g de SFBL e produziu altos rendimentos de ésteres etílicos (92%) em 31 h. Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho foi de aumentar em pelo menos dez vezes a escala da produção de biodiesel a partir deste processo. Para tanto, foi montado um biorreator de leito fixo com três colunas em série preenchido com 120 g de SFBL, com circulação do meio reacional composto por oleína e etanol (1245 g). Para a remoção da água formada na reação, foi dimensionado um reservatório de meio reacional com barreira física, que favoreceu o aumento da velocidade inicial da reação, obtendo-se 88% de rendimento em 24 h. O sistema foi operado por 6 ciclos consecutivos de síntese (288 h). A conversão obtida ao final do primeiro ciclo, 91%, decresceu para 51% no final do sexto ciclo reacional. No primeiro ciclo, foi produzido 1 kg de ésteres e, até o sexto ciclo, foram acumulados 4,7 kg de ésteres, o que é equivalente a uma produção de 39 g de éster por g de sólido fermentado. Estes resultados são promissores, pois mostram que altas conversões podem ser mantidas no escalonamento do processo enzimático de produção do biodiesel usando sólidos fermentados como catalisadores.

Palavras-chave: biodiesel, aumento de escala, esterificação, lipases, *Burkholderia lata*, fermentação em estado sólido, reator de leito fixo.

## ABSTRACT

The ethyl esters that comprise biodiesel are produced industrially by homogeneous alkaline transesterification of the triacylglycerols of vegetable oils with methanol. This process requires steps for the removal from the biodiesel of the catalyst and of the salt that is formed, for the treatment of the alkaline effluent that is generated and for the recovery of the glycerol by product that is produced. Beyond this, the oil must be neutral and have a low moisture content, meaning that it makes a significant contribution to the cost of the biodiesel. One possible strategy for avoiding problems associated with chemical catalysis is to use lipases as catalysts, given that they can catalyze both esterification and transesterification and do not require highly purified raw materials. Recently, a process was developed in the Enzyme Technology and Biocatalysis Laboratory of the Federal University of Paraná, with the intention of reducing the costs of the enzymatic route. This process uses a fermented solid, produced using *Burkholderia lata* (denominated FSBL), to catalyze the ethyl esterification of fatty acids obtained from soybean soapstock. The process was operated at laboratory scale, using a packed-bed bioreactor containing 12 g of FSBL, and gave high ester yields, of 92% in 31 h. The objective of the current work was to increase the scale of this biodiesel production process at least 10-fold. To this end, a bioreactor consisting of three packed-beds in series was filled with a total of 120 g of FSBL and 1245 g of a medium comprised of olein and ethanol was recirculated through the reactor from a reservoir. The reservoir had an internal weir in order to retain the aqueous phase, such that only the organic phase was fed back to the reactor. This water removal strategy increased the initial velocity of reaction, giving 88% conversion in 24 h. This system was operated for six consecutive 48-h cycles of ester synthesis. The conversion that was obtained decreased from 91% at the end of the first reaction cycle to 51% at the end of the sixth reaction cycle. In the first cycle, 1 kg of esters was produced, while the six cycles produced a cumulative total of 4.7 kg of esters, which is equivalent to 39 g of ester produced per g of fermented solid that was used. These results are promising, since they demonstrate that high yields can be maintained in the scale-up of enzymatic biodiesel production processes involving fermented solids as the catalyst.

Keywords: biodiesel, scale-up, esterification, lipases, *Burkholderia lata*, solid-state fermentation, packed-bed reactor



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA SÍNTESE DO BIODIESEL .....	21
FIGURA 2 - ETAPAS DO PROCESSO DE HIDROESTERIFICAÇÃO.....	23
FIGURA 3 - ESQUEMA DO REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Burkholderia lata</i> .....	50
FIGURA 4 - REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE COM DETALHE DA RETIRADA DAS ALÍQUOTAS ENTRE AS COLUNAS. ....	52
FIGURA 5 - ESQUEMA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS.....	54
FIGURA 6 - ESQUEMA DO RESERVATÓRIO COM SEPARAÇÃO DA FASE AQUOSA E AGITAÇÃO DA FASE ORGÂNICA.....	56
FIGURA 7 - ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Burkholderia lata</i> DURANTE O ARMAZENAMENTO A 4°C .....	70
FIGURA 8 - DIFERENTES SUBSTRATOS UTILIZADOS NA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATOR DE LEITO FIXO .....	73
FIGURA 9 - ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATORES DE LEITO FIXO DE DIFERENTES TAMANHOS .....	74
FIGURA 10 - ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE OPERANDO EM MODO CONTÍNUO .....	78
FIGURA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS CINÉTICAS DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM DIFERENTES TAMANHOS DE REATORES DE LEITO FIXO.....	82
FIGURA 12 - REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO NA ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE ....	83
FIGURA 13 - EFEITO DA RAZÃO MOLAR NA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO NA PRIMEIRA COLUNA DO	

REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS	86
FIGURA 14 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO E TEOR DE UMIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO USADO EM REAÇÕES COM DIFERENTES RAZÕES MOLARES NA PRIMEIRA COLUNA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS	87
FIGURA 15 - SEPARAÇÃO DE FASES E DISTRIBUIÇÃO DA CONVERSÃO NO RESERVATÓRIO DE MEIO REACIONAL	89
FIGURA 16 - EFEITO DA RAZÃO MOLAR NA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO NA SEGUNDA COLUNA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS	90
FIGURA 17 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO E TEOR DE UMIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO USADO EM REAÇÕES COM DIFERENTES RAZÕES MOLARES NA SEGUNDA COLUNA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS	91
FIGURA 18 - INFLUÊNCIA DA REMOÇÃO DA FASE AQUOSA POR BARREIRA FÍSICA NO RESERVATÓRIO DE MEIO REACIONAL E AGITAÇÃO DA FASE ORGÂNICA NA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATOR DE LEITO FIXO	94
FIGURA 19 - ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATORES DE LEITO FIXO DE DIFERENTES TAMANHOS	95
FIGURA 20 - REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO NA ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE	96

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ESTUDOS RECENTES SOBRE A SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM LIPASES EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTE .....	34
TABELA 2- EMPRESAS QUE UTILIZAM A CATÁLISE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIODIESEL .....	41
TABELA 3- CARACTERIZAÇÃO DA OLEÍNA BIDEDESTILADA .....	72
TABELA 4- ESTUDOS RECENTES QUE UTILIZARAM REATORES DE LEITO FIXO OPERANDO EM MODO CONTÍNUO PARA A SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM CATÁLISE ENZIMÁTICA .....	80
TABELA 5- ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES DO BIODIESEL COM APLICAÇÃO DIRETA DE SÓLIDOS FERMENTADOS .....	98

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGBS	Ácidos graxos da borra de soja
AGL	Ácido graxo livre
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	<i>American Oil Chemist's society</i>
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
CCD	Cromatografia de camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
<i>FAeSTER</i>	<i>Fatty Acid eSTERification</i>
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
FSD	Farinha de semente de girassol
gSS	Gramas de sólido fermentado seco
IA	Índice de acidez
IS	Índice de saponificação
LA	Luria Agar (meio de cultura)
LB	Luria Bertani (meio de cultura)
LipBL	Lipase de <i>Burkholderia lata</i>
LTEB	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
NPDEAS	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável
<i>PBR</i>	<i>Packed-bed reactor</i>
PVC	Cloreto de polivinila
RFA	Renewable Fuels Association
RM	Razão molar

SFBL	Sólido fermentado por <i>Burkholderia lata</i>
SF	Sólido Fermentado
STR	<i>Stirred tank reactor</i>
TAG	Triacilglicerol
U	Unidades de atividade enzimática ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )
UFPR	Universidade Federal do Paraná

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 BIODIESEL .....	18
2.1.1 Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel .....	18
2.1.2 Sistemas de Produção de Biodiesel .....	21
2.2 UTILIZAÇÃO DE LIPASES NA SÍNTESE DE ÉSTERES DO BIODIESEL	23
2.2.1 Lipases: Conceito e aplicações .....	23
2.2.2 Lipases: Fontes e características .....	24
2.2.3 Lipases de <i>Burkholderia lata</i> .....	25
2.2.4 Produção de lipases por fermentação em estado sólido .....	26
2.3 ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES DO BIODIESEL MEDIADA POR LIPASES .....	27
2.3.1 Aplicação de sólidos fermentados com atividade lipolítica na síntese de ésteres do biodiesel .....	28
2.3.2 Sistemas reacionais .....	30
2.3.3 Fatores que afetam a síntese enzimática de ésteres do biodiesel .....	31
2.3.4 Estudos de síntese de ésteres do biodiesel por esterificação enzimática em sistemas livres de solvente.....	32
2.4 REATORES UTILIZADOS NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DO BIODIESEL .....	37
2.5 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIODIESEL MEDIADA POR LIPASES.....	40
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 JUSTIFICATIVA .....	43
3.2 OBJETIVOS .....	43
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 MATERIAL, MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES .....	44
4.2 PRODUÇÃO DA LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO..	45

4.2.1 Micro-organismo e manutenção .....	45
4.2.2 Inóculo.....	46
4.2.3 Fermentação em estado sólido (FES) .....	46
4.2.4 Estabilidade do sólido fermentado ao armazenamento.....	47
4.2.5 Delipidação do sólido fermentado .....	48
4.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATORES DE LEITO FIXO .....	48
4.3.1 Estudos preliminares .....	48
4.4 ESTUDOS DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATORES DE LEITO FIXO EM SÉRIE .....	51
4.4.1 Síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo em série operando em modo contínuo.....	51
4.4.2 Síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo em série operando em modo de batelada.....	52
4.4.3 Reutilização do SFBL em reações de esterificação .....	53
4.5 ESTUDOS DE VARIÁVEIS DO PROCESSO E SEUS EFEITOS NA CONVERSÃO DE ÉSTERES.....	53
4.5.1 Influência da razão molar dos substratos nas colunas do reator de leito fixo com duas colunas sequenciais .....	53
4.5.2 Influência da remoção da água por barreira física no reservatório e da agitação do meio reacional nas reações de esterificação .....	55
4.6 AUMENTO DE ESCALA DO PROCESSO DE SÍNTESE DE ÉSTERES EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE.....	55
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	57
4.7.1 Determinação do teor de umidade .....	57
4.7.2 Determinação da atividade lipolítica do sólido fermentado.....	57
4.7.2.1 Atividade de hidrólise .....	57
4.7.2.2 Atividade de esterificação.....	58
4.7.3 Método de Lowry e Tinsley.....	59
4.7.4 Cromatografia em camada delgada .....	59
4.7.5 Cromatografia em fase gasosa .....	60
4.7.6 Métodos de análise do substrato das reações de esterificação .....	60
4.7.6.1 Determinação do perfil de ácidos graxos da oleína.....	60
4.7.6.2 Determinação do índice de acidez e do teor de ácidos graxos livres...	61
4.7.6.3 Determinação do índice de iodo.....	63

4.7.6.4 Determinação do índice de saponificação .....	64
4.7.6.5 Determinação do teor de água .....	64
4.7.7 Métodos de análise das reações de esterificação .....	65
4.7.7.1 Quantificação dos etil-ésteres .....	65
4.7.7.2 Quantificação do etanol .....	67
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS AMOSTRAS .....	68
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
5.1 PRODUÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Burkholderia lata</i> .....	69
5.1.1 Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco durante o armazenamento .....	69
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO PARA AS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO .....	70
5.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATOR DE LEITO FIXO .....	73
5.3.1 Estudos preliminares .....	73
5.4 ESTUDOS DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATORES DE LEITO FIXO EM SÉRIE .....	75
5.4.1 Síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo em série operando em modo contínuo.....	75
5.4.2 Síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo em série operando em modo de batelada.....	81
5.4.3 Reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação .....	81
5.5 ESTUDOS DE VARIÁVEIS DO PROCESSO E SEUS EFEITOS NA CONVERSÃO EM ÉSTERES .....	84
5.5.1 Influência da razão molar dos substratos na primeira coluna do reator de leito fixo com duas colunas sequenciais .....	84
5.5.2 Influência da razão molar dos substratos na segunda coluna do reator de leito fixo com duas colunas sequenciais .....	88
5.5.3 Influência da remoção da água por barreira física no reservatório e agitação do meio reacional nas reações de esterificação .....	93
5.6 AUMENTO DE ESCALA DO PROCESSO DE SÍNTESE DE ÉSTERES EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE.....	94
5.7 DISCUSSÃO GERAL .....	97



<b>6. CONCLUSÕES</b>	100
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	101
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	103
<b>ANEXO</b>	119
CÁLCULOS DE EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO	119
<b>APÊNDICES</b>	121
A. IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA <i>Burkholderia lata</i>	121
B. CROMATOGRAMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA OLEÍNA BIDEDESTILADA	125
C. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA	127
D. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA	128

## 1. INTRODUÇÃO

A produção do biodiesel como um combustível alternativo para substituir parcial ou totalmente o petrodiesel vem recebendo grande atenção, pelo fato do biodiesel ser renovável e biodegradável e apresentar um perfil de menor emissão de monóxido de carbono, enxofre e material particulado durante a combustão (CORDEIRO et al., 2011; ZHANG et al., 2003). Atualmente, outros fatores importantes no contexto mundial em favor da utilização do biodiesel são a crescente demanda por energia, o aquecimento global e o aumento de preço dos derivados do petróleo. O biodiesel é produzido, principalmente, através de reações de esterificação e transesterificação, por catálise química ou enzimática. Contudo, a produção enzimática de biodiesel merece destaque, pois o uso de lipases favorece a produção de ésteres com elevada pureza (YAAKOB et al., 2013; ATADASHI et al., 2012).

Algumas lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) apresentam altos níveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, como é o caso da síntese do biodiesel, o que facilita a sua aplicação em reações como a esterificação e a transesterificação. No entanto, o alto custo das enzimas comerciais dificulta a utilização das lipases nesses processos. Uma alternativa é o uso de sólidos fermentados com atividade lipolítica que têm potencial para reduzir os custos na síntese enzimática de biodiesel (ZAGO et al., 2014; SOARES et al., 2013; SALUM et al., 2010; FERNANDES et al., 2007).

A produção de lipases microbianas para utilização em reações de esterificação e transesterificação tem sido feita, geralmente, por fermentação submersa. Contudo, a fermentação em estado sólido (FES) é preferível, pois neste processo a lipase produzida fica naturalmente aderida sobre o sólido, e pode ser utilizada em reações sem a necessidade de extração e purificação o que alia, em uma só etapa, a produção e a imobilização da enzima (SALUM et al., 2010; FERNANDES et al., 2007). As lipases imobilizadas atuam como catalisadores em meio heterogêneo, e seu uso é mais indicado em reatores de leito fixo, pois, além do menor custo operacional, esses reatores permitem alta razão de atividade por volume de meio de reação, possibilidade de reutilização da enzima sem a necessidade de separação do meio reacional e minimização

dos danos ao biocatalisador devido à menor tensão de cisalhamento (WATANABE et al., 2001).

Nos processos que envolvem a catálise enzimática, o uso de solventes hidrofóbicos tem sido muito difundido, pois estes aumentam a solubilidade dos substratos e também geralmente preservam a estabilidade da enzima. Entretanto, é mais interessante realizar a reação em sistema livre de solvente orgânico, ou seja, aquele em que apenas os substratos compõem o meio reacional, uma vez que esse sistema pode reduzir o custo do processo, pois não são necessárias etapas de purificação do produto final para remoção do solvente (TONGBORIBOON; CHEIRSILP; HKITTIKUN, 2010).

Recentemente, no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) da Universidade Federal do Paraná foi desenvolvido um processo com o intuito de reduzir os custos na produção enzimática do biodiesel, que consistiu na esterificação etílica de ácidos graxos da borra de soja (AGBS), com um sólido fermentado por *Burkholderia lata* CPQBA 515-12 DRM 01 (SFBL) (SOARES et al., 2013). O melhor resultado foi obtido em sistema livre de solvente em uma razão molar de etanol para ácidos graxos de 1,5:1 a 45°C, em um reator de leito fixo. A coluna continha 12 g de sólido fermentado e 125 g de meio reacional foram circulados pela coluna, propiciando 92% de conversão em éster em 31 h (SOARES et al., 2013).

A proposta deste trabalho é de aumentar a escala do processo desenvolvido por Soares et al. (2013). A matéria graxa escolhida para este estudo foi a oleína bidestilada, que é uma mistura de ácidos graxos livres, amplamente disponível, vendida comercialmente e que tem o ácido oleico como componente majoritário. As reações foram conduzidas inicialmente em um reator de leito fixo de uma coluna, com capacidade para 40 g de SFBL e se chegou até um reator de três colunas, com capacidade para 120 g de SFBL e 1245 g de meio reacional. Neste trabalho, também foi proposta a utilização de um reservatório com barreira física para remoção da fase aquosa formada durante a reação de esterificação, com o objetivo de favorecer a síntese de ésteres.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIODIESEL

No Brasil, biodiesel é definido como combustível composto de alquil-ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda às especificações contidas na Resolução nº 14, de 11 de maio de 2012 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), que regula o setor no Brasil (BRASIL, 2012).

O governo brasileiro vem instituindo programas, leis e resoluções, no sentido de incentivar a produção de biodiesel, o que propicia a redução das importações do petrodiesel e contribui positivamente para a balança comercial do país. Desde novembro de 2014, através da Lei nº 13.033 de 24 de setembro de 2014, o percentual obrigatório do biodiesel misturado ao petrodiesel comercializado no território brasileiro é de 7%. Atualmente, existem 58 unidades ativas produtoras de biodiesel no Brasil, que, juntas, produzem cerca de 21 mil m<sup>3</sup> por dia (ANP, 2014).

#### 2.1.1 Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel

Biodiesel pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, classificadas em quatro grupos principais: óleos vegetais (comestíveis e não comestíveis), gorduras animais, óleos residuais e óleos de algas (BANKOVIĆ-ILIĆ; STAMENKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2012; CHEN et al., 2011). O grupo dos óleos vegetais é o mais utilizado mundialmente, dentre os quais se destacam os óleos de soja, canola e palma (GIAKOUMIS, 2013). No Brasil, o óleo de soja é o mais usado: em novembro de 2014, este óleo foi responsável por 74,28% da produção de biodiesel (ANP, 2014). Contudo, o uso de matérias-primas refinadas, com baixo índice de acidez, apresenta duas desvantagens. Primeiro,

faz com que o custo da matéria-prima seja responsável por 70 a 95% do custo total de produção (BALAT, 2011). Segundo, a utilização de óleos comestíveis para produção do biodiesel compete com o mercado alimentício. Em 2007, cerca de 7% do óleo comestível produzido no mundo foram utilizados para a produção de biodiesel. Dessa forma, é essencial selecionar matérias-primas que assegurem a viabilidade econômica e ambiental do processo de produção do biodiesel, tais como as provenientes de oleaginosas não comestíveis e óleos residuais (HAMA; KONDO, 2013).

Há várias matérias-primas alternativas para a produção de biodiesel e, entre elas, o óleo do pinhão-manso e os óleos alimentares usados merecem destaque. O pinhão-manso é uma árvore de fácil cultivo, pouco exigente com água e fertilizantes e pode ser plantada em áreas não agricultáveis. Suas sementes têm de 30 a 50% do peso em óleo não comestível que produz um biodiesel estável à oxidação semelhante aos produzidos pelos óleos de soja e colza. A mistura do óleo do pinhão-manso ao óleo de palma tem sido recomendada para produzir um biodiesel mais estável a baixas temperaturas (VENY et al., 2014; AZÓCAR et al., 2010; SARIN et al., 2007). Já os óleos alimentares usados são fontes potenciais na produção do biodiesel, principalmente pelo seu baixo custo e pela sua grande oferta. Esses óleos são gerados principalmente a partir de óleos vegetais utilizados em altas temperaturas para fritar alimentos. Os óleos alimentares usados são duas a três vezes mais baratos que os óleos vegetais virgens e podem produzir um biodiesel com qualidade semelhante (BALAT, 2011; PHAN; PHAN, 2008)

Entretanto, a utilização de um material de partida alternativo como o óleo de fritura pode interferir negativamente no processo de produção do biodiesel, pois estes óleos podem estar contaminados com água, ácidos graxos livres (AGLs) e compostos de oxidação como peróxidos, hidroperóxidos, aldeídos e cetonas, que dificultam a conversão. Na reação de transesterificação alcalina, a presença de água pode levar à hidrólise dos triacilgliceróis, a presença de AGLs leva à formação indesejável de sabões e os compostos de oxidação, por serem de difícil remoção, permanecem no produto final, o que gera um biodiesel danoso aos motores de ciclo diesel pela formação do depósito desses compostos (VÉRAS et al., 2011; CVENGROS; CVENGROSOVÁ, 2004; MA; HANNA, 1999). Além disso, algumas das propriedades do material de partida

são integralmente transferidas para o produto, que o distancia das especificações. Por exemplo, uma matéria-prima composta majoritariamente por ácidos graxos insaturados irá gerar um biodiesel mais vulnerável à oxidação, enquanto que materiais compostos por ácidos graxos saturados irão produzir um biodiesel com problemas de fluxo a frio, que o torna inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel em climas frios (SUAREZ et al., 2007; RAMOS et al., 2003; CANACKI; GERPEN, 1999).

Mais recentemente, ácidos graxos da borra de soja (AGBS) também foram utilizados na síntese de biodiesel (BOTTON, 2014; SOARES et al., 2013). Os AGBS são produzidos a partir da hidrólise do óleo ácido da borra de soja (*soapstock*), que contém entre 85-95% de matéria graxa saponificável e é composta geralmente por 59% de AGLs, 28% de triacilgliceróis, 5% de di- e monoacilgliceróis e um percentual de substâncias não-graxas (HAAS et al., 2003). O óleo ácido da borra de soja é uma matéria-prima alternativa como fonte de ácidos graxos de baixo custo e o seu valor é a metade do óleo de soja refinado (HAAS, 2005; HAAS; BLOOMER; SCOTT, 2000).

Álcoois de cadeia curta são utilizados como doadores de acila na síntese do biodiesel, sendo que atualmente, o metanol é o mais usado mundialmente na indústria, em virtude da sua maior polaridade e consequente maior reatividade, pela melhor separação de fases na purificação do biodiesel e ainda pelo seu menor custo em relação aos outros álcoois. Contudo, o metanol é obtido a partir do petróleo, de origem fóssil não renovável (ANP, 2014) e, portanto, não é interessante do ponto de vista ambiental.

O etanol é o segundo álcool mais utilizado na indústria para produção do biodiesel. Esse álcool é obtido principalmente de fontes renováveis, sendo o milho e a cana-de-açúcar as matérias-primas mais utilizadas (VÉRAS et al., 2011). Entretanto, apesar de o Brasil ser o segundo maior produtor mundial de etanol, a indústria do biodiesel utiliza principalmente o metanol (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - RFA, 2013). Outros álcoois, tais como 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol já foram usados em pesquisas para produção de biodiesel (YAN et al., 2014; AKOH et al., 2007), mas têm o seu uso restrito porque são caros e menos abundantes.

### 2.1.2 Sistemas de Produção de Biodiesel

Os ésteres alquílicos que compõem o biodiesel podem ser sintetizados por duas reações distintas: pela transesterificação ou pela esterificação. Na reação de transesterificação, o triacilglicerol (TAG) reage com um álcool de cadeia curta, na presença de um catalisador e produz os ésteres alquílicos e o glicerol como subproduto (Figura 1). A transesterificação envolve uma sequência de três reações reversíveis e consecutivas, em que são formados di- e monoacilgliceróis como intermediários. Essas reações podem ser catalisadas por via química (ácida ou básica) com catalisadores homogêneos ou heterogêneos, ou por via enzimática, onde os catalisadores são as lipases.

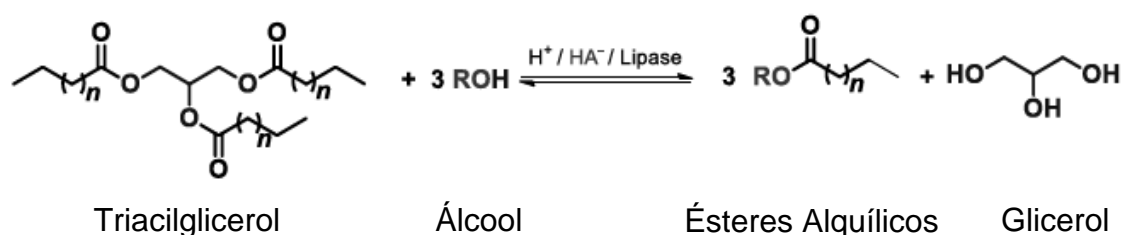


FIGURA 1 - REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA SÍNTESE DO BIODIESEL

A transesterificação alcalina homogênea, amplamente empregada na indústria do biodiesel, apresenta conversões dos triacilgliceróis em ésteres acima de 95% (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014). As condições clássicas descritas para essa reação são razão molar 6:1 (metanol:TAG), 0,5 a 1% (fração mássica) de catalisador alcalino (com relação ao TAG), temperatura de 60°C e o processo tem duração de 1 h (BANKOVIĆ-ILIĆ; STAMENKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2012; MATH; KUMAR; CHETTY, 2010; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984). Como catalisadores, são usados hidróxidos de metais (KOH e NaOH) ou alcóxidos de metais alcalinos (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

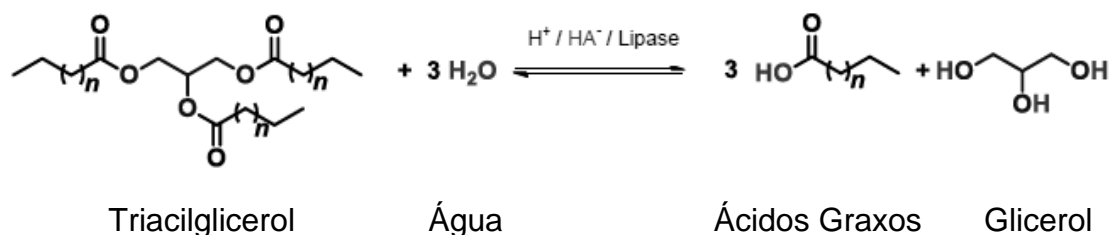
Embora a transesterificação alcalina homogênea seja muito utilizada na produção de biodiesel, há algumas desvantagens relacionadas a ela, sendo as principais a necessidade de remoção, ao final da reação, do catalisador utilizado e do sal formado, de tratar os efluentes alcalinos gerados e ainda de recuperar o glicerol produzido. Além disso, para esse processo, é necessário o uso de matérias-primas neutras, com baixos níveis de umidade (abaixo de 0,5%) e de ácidos graxos livres (abaixo de 1%), pois, como já mencionado, a água pode hidrolisar os TAGs e também os monoésteres graxos. Os AGLs consomem o catalisador e formam sabão, que, por sua vez, pode emulsionar os produtos, o que dificulta a purificação do biodiesel (VÉRAS et al., 2011; MA; HANNA, 1999).

Quando se utilizam matérias-primas de baixo custo, que normalmente contêm quantidades significativas de água e AGLs, o processo de hidroesterificação é mais apropriado do que a transesterificação. Esse processo envolve duas etapas, sendo que, na primeira, ocorre a hidrólise dos TAGs, onde é formado glicerol e AGLs e, na segunda, acontece a esterificação dos AGLs, onde os ácidos graxos reagem com o álcool e formam ésteres alquílicos e água como subproduto (Figura 2). Outra vantagem desse processo é que o glicerol é separado na primeira etapa e não entra em contato com o álcool, sendo, portanto, mais puro do que o obtido por transesterificação (SOARES et al., 2013).

Ambas as etapas do processo de hidroesterificação podem ser catalisadas por via química ou enzimática, na qual os catalisadores são as lipases. A hidrólise dos TAGs também pode ocorrer na ausência de catalisador e, nesse caso, pode ser feita em água subcrítica (SOARES et al., 2013). Vários catalisadores têm sido utilizados para esterificação de AGLs, tais como: óxidos de titânio, zircônio, nióbio, e resinas trocadoras de íons. Geralmente, nessas reações, são utilizadas temperaturas acima de 100°C (BORGES; DIAZ, 2012). Como alternativa para reduzir a temperatura de trabalho, o uso de lipases imobilizadas é indicado, pois facilita a recuperação do produto e permite a reutilização do biocatalisador.



### Hidrólise



### Esterificação

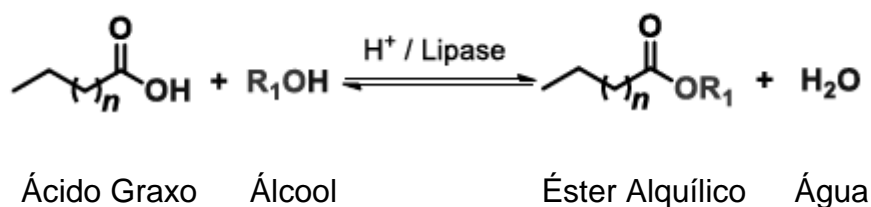


FIGURA 2 - ETAPAS DO PROCESSO DE HIDROESTERIFICAÇÃO

## 2.2 UTILIZAÇÃO DE LIPASES NA SÍNTESE DE ÉSTERES DO BIODIESEL

### 2.2.1 Lipases: Conceito e aplicações

As lipases catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis de cadeia longa e produzem di- e monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos (JAEGER; REETZ, 1998). Essas enzimas também são capazes de catalisar reações em sistemas não-aquosos, o que confere a elas um grande potencial para uso na síntese de ésteres do biodiesel (GULDHE et al., 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014).

Lipases possuem uma estrutura de dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase que apresenta um núcleo central composto por uma folha  $\beta$  pregueada, consistindo de oito diferentes fitas  $\beta$  antiparalelas, conectadas, interligadas e envolvidas por cinco  $\alpha$ -hélices (BORNSCHEUER, 2002; POUDEROYEN et al., 2001). O sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica, formado pelas cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos serina, histidina e aspartato ou glutamato. O resíduo de serina é responsável pela catálise e encontra-se ligado por ligações de hidrogênio à cadeia lateral do resíduo de histidina, que, por sua vez, encontra-se ligado por ligações de hidrogênio a um resíduo de aspartato ou glutamato (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER et al., 1994).

Na maioria das lipases, o sítio ativo é coberto por uma “tampa” (*lid*) com características hidrofóbicas. Esta tampa é uma estrutura helicoidal que, em meios aquosos na ausência de um substrato hidrofóbico, deixa o sítio ativo inacessível ao substrato. Na presença de substratos hidrofóbicos, ocorre a adsorção da enzima na interface hidrofóbica e, então, a tampa move-se, e altera a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o sítio ativo acessível ao substrato. Esse fenômeno é chamado de ativação interfacial (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; CYGLER; SCHRAG, 1997).

As lipases, além de serem amplamente usadas na síntese de ésteres do biodiesel em reações de esterificação e transesterificação (GULDHE et al., 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014), podem ser utilizadas na indústria alimentícia, para conferir ou modificar propriedades organolépticas dos alimentos, na área médica, para dosagem de triglicerídeos no sangue, na indústria farmacêutica, para resolução de misturas racêmicas, na engenharia ambiental, para tratamento de efluentes, na indústria de papel e na produção de cosméticos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

### 2.2.2 Lipases: Fontes e características

As lipases são comumente encontradas na natureza e podem ser obtidas a partir de plantas, animais e micro-organismos selvagens ou geneticamente modificados. As lipases microbianas têm sido amplamente

aplicadas para catalisar reações de síntese de ésteres devido à facilidade de cultivo e de manipulação genética dos micro-organismos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; REETZ, 1998). As características e as propriedades físico-químicas das lipases microbianas apresentam variações, tais como especificidade em presença de diferentes substratos, estabilidade em pH, temperatura e solventes orgânicos. Essas variações ocorrem entre os gêneros e até entre as isoformas da enzima produzidas pelo mesmo micro-organismo (FORESTI; FERREIRA, 2005).

A especificidade de uma lipase está relacionada com as propriedades moleculares da enzima, com a estrutura do substrato e com fatores que afetam a ligação enzima-substrato. A especificidade da enzima pode ser classificada em relação: (a) à regiosseletividade - as enzimas hidrolisam ligações ésteres de acordo com a posição na molécula, podendo ser *sn*-1,3 ou *sn*-1,2 específicas, ou aleatoriamente em qualquer ligação, e, neste caso, são inespecíficas; (b) à tiposseletividade - preferência por ácidos graxos com comprimentos de cadeia e graus de insaturação específicos; (c) à estereosseletividade - discriminação entre enantiômeros em misturas racêmicas. As lipases podem também apresentar a combinação de mais de um tipo de especificidade (JENSEN; GALLUZZO; BUSH, 1990).

### 2.2.3 Lipases de *Burkholderia lata*

*B. lata*, espécie descrita por Vanlaere et al. (2009), anteriormente denominada *Pseudomonas cepacia*, é um dos integrantes do complexo *B. cepacia*, um grupo de bactérias gram-negativas que são comumente encontradas na natureza. Algumas cepas desse grupo exibem potencial biotecnológico, com aplicações em biocontrole, biorremediação e promoção de crescimento em plantas (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001), ao passo que outras cepas são patógenas oportunistas para plantas e indivíduos imunodeficientes (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008).

A cepa *B. lata* CPQBA 515-12 DRM 01, utilizada neste trabalho, produz uma lipase (LipBL) com massa molecular de aproximadamente 33 kDa. Em

estudos de estabilidade, a atividade inicial desta lipase foi mantida após incubação por 1 h a 30°C em isopropanol, butanol, tolueno, *n*-hexano e *n*-heptano (LIMA et al., 2004). As maiores atividades foram observadas nas faixas de 37 a 65°C e de pH entre 6 a 8 (LIMA et al., 2004). LipBL foi aplicada em reações de transesterificação para resolução de misturas racêmicas de álcoois alílicos secundários. Foi obtido, na transesterificação de (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol com vinil acetato, um coeficiente de enantiosseletividade ( $E_R$ ) de 110 a 29°C, com *n*-hexano como solvente (MOURE et al., 2013).

LipBL também foi utilizada em estudos de síntese de ésteres do biodiesel (BARON et al., 2014; SOARES, 2014; SOARES et al., 2013; BARON et al., 2011; SALUM et al., 2010; SALUM et al., 2008; FERNANDES et al., 2007). Esses estudos mostram que LipBL catalisa reações com diferentes materiais de partida, como o ácido oleico, a mistura de ácidos graxos obtidos de *soapstock* (AGBS), óleos de soja, mamona e milho, em reações de esterificação e transesterificação, na presença ou não de solventes. Nestes estudos, utilizou-se LipBL imobilizada no polipropileno Accurel (BARON et al., 2014; BARON et al., 2011; SALUM et al., 2008), ou nos sólidos fermentados (SOARES et al., 2013; SALUM et al., 2010; FERNANDES et al., 2007). Na fermentação em estado sólido (FES), a lipase produzida permanece imobilizada naturalmente sobre o sólido fermentado que pode ser utilizado diretamente em reações, sem a necessidade de extração e posterior imobilização das lipases, o que contribui para diminuir os custos de produção e purificação destas enzimas.

#### 2.2.4 Produção de lipases por fermentação em estado sólido

A FES envolve o cultivo de micro-organismos nas superfícies de partículas orgânicas úmidas, dentro de um leito em que há uma fase gasosa contínua nos poros entre as partículas sólidas (MITCHELL et al., 2006; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002). Nesse sistema, a umidade é limitada,

entretanto a atividade de água tem que ser suficientemente alta para o micro-organismo.

Um fator chave da FES é o substrato utilizado, que pode servir somente como um suporte inerte (por exemplo, espuma de poliuretano), que, nesse caso, é suplementado com meio rico em nutrientes. Alternativamente, o substrato pode servir tanto como suporte quanto como fonte de nutrientes, como é o caso dos resíduos agroindustriais, que também são biodegradáveis e obtidos a partir de fontes renováveis (MARTINEZ-RUIZ et al., 2008; YANG et al., 2005; PANDEY, 2003). Para a produção de lipases, os resíduos agroindustriais mais utilizados são as tortas originadas dos processos de extração do óleo de sementes (milho, girassol e soja) e bagaços da indústria de processamento do amido ou da cana-de-açúcar (KRISHNA, 2005; LEAL et al., 2002; GOMBERT et al., 1999).

Apesar das lipases microbianas serem tradicionalmente obtidas por fermentação submersa (FS), a técnica de fermentação em estado sólido (FES) vem sendo amplamente estudada nos últimos anos (SALIHU et al., 2012; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002). Em comparação com a FS, as vantagens da FES estão no baixo custo das matérias-primas empregadas, no meio de cultivo (quando se utiliza resíduos agroindustriais), na simplicidade do meio de fermentação e na menor demanda energética (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003). No entanto, fatores como a falta de homogeneidade do meio e a dificuldade de medida e controle dos parâmetros de aeração, pH, temperatura e umidade precisam ser superados na FES para a sua utilização em grande escala (COUTO; SANROMÁN, 2006).

### 2.3 ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES DO BIODIESEL MEDIADA POR LIPASES

A maioria dos estudos sobre a aplicação de lipases na produção de biodiesel ainda são desenvolvidos em escala laboratorial e somente uma pequena fração das empresas que produzem biodiesel em escala industrial utiliza a rota enzimática (GULDHE et al., 2015; CHRISTOPHER; KUMAR;

ZAMBAREET, 2014). Na maioria dos casos, o processo enzimático não consegue competir com o processo químico, o que se deve principalmente à baixa produtividade causada pelo longo tempo de reação requerido nos processos e pelo alto custo do biocatalisador.

Os tópicos a seguir versarão sobre a FES como alternativa para redução dos custos na produção de lipases, os sistemas reacionais utilizados e os fatores que influenciam na catálise enzimática, bem como as formas mais eficientes de intervenção nos processos como tentativa de tornar a catálise enzimática competitiva.

### 2.3.1 Aplicação de sólidos fermentados com atividade lipolítica na síntese de ésteres do biodiesel

Para a redução de custos, sólidos fermentados com atividade lipolítica foram usados na síntese de ésteres do biodiesel (AGUIEIRAS et al., 2014; BOTTON, 2014; LIU et al., 2014; ZAGO et al., 2014; LIU et al., 2013; SOARES et al., 2013; SALUM et al., 2010). A técnica foi usada pela primeira vez em reações de esterificação e transesterificação por Fernandes et al. (2007). Nesse trabalho, foi utilizado farelo de milho para produzir um sólido (SFBL) que, depois de liofilizado, foi aplicado para esterificar ácido oleico com etanol, na presença de *n*-heptano. Foi obtida uma conversão em ésteres de 94% em 18 h. Nos estudos de transesterificação, com etanol e óleo de milho como substratos na razão molar de 6:1, a conversão obtida foi de 95% em 120 h.

Prosseguindo com os estudos, Salum et al. (2010) produziram um novo SFBL, baseado em farelo de semente de girassol e bagaço de cana, que tinha 234 U g<sup>-1</sup>SS de atividade de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila, o que correspondia ao dobro da atividade obtida por Fernandes et al. (2007). Em reações de transesterificação em sistema livre de solvente, foram obtidos 95% de conversão em 46 h de reação, com meio reacional formado por etanol e óleo de soja na razão molar de 3:1.

Um sólido fermentado por *Burkholderia cenocepacia* foi recentemente aplicado em reações de transesterificação para produção de biodiesel (LIU et

al., 2014; LIU et al., 2013). Nesses estudos, a FES foi realizada a partir de uma mistura de bagaço de cana e farelo de semente de girassol e o sólido produzido foi aplicado em um meio composto por etanol e óleo de soja na razão molar de 4:1, solubilizados em *tert*-butanol, sendo obtidos 86% de conversão em ésteres, em 96 h (LIU et al., 2013).

Também baseado em bagaço de cana e farelo de semente de girassol, Zago et al. (2014) produziram um sólido fermentado por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM que foi utilizado na etanólise do óleo de milho e relataram uma conversão de 68% em 72 h.

Soares et al. (2013) utilizaram um SFBL na síntese de ésteres do biodiesel por esterificação. Nesse trabalho, os autores reduziram os custos na secagem de SFBL pela substituição da liofilização por secagem com ar seco em coluna. Foram utilizados etanol e AGBS na razão molar de 3:1, e obteve-se 92% de conversão em 31 h.

Aguieiras et al. (2014) também desenvolveram um processo de síntese de biodiesel por esterificação. Nesse estudo, foi utilizada torta de babaçu para produzir um sólido fermentado do fungo *Rhizomucor miehei*. Os autores aplicaram esse sólido em um meio que tinha etanol e AGLs (obtidos pela hidrólise do óleo de macaúba), na razão molar de 2:1 e relataram 91% de conversão em 8 h da reação. Ainda neste trabalho, foi feita uma comparação entre o sólido fermentado e as enzimas comerciais Novozym 435<sup>®</sup> e Lipozyme RM IM. A cinética de produção dos ésteres catalisada pelo sólido fermentado foi semelhante àquelas das lipases comerciais imobilizadas.

Os trabalhos citados sinalizam o potencial da aplicação direta de sólidos fermentados com atividade lipolítica na síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, que compõem o biodiesel. Entretanto, até o momento, não foram realizados estudos suficientes de comparação entre esses sólidos fermentados e as lipases comerciais para embasar uma discussão de viabilidade econômica.

### 2.3.2 Sistemas reacionais

Os principais sistemas utilizados como meios reacionais para síntese enzimática de ésteres de biodiesel são: (1) sistema em presença de solvente hidrofóbico que não participa na reação; e (2) sistema livre de solvente, onde o meio reacional é composto apenas pelas espécies envolvidas na reação (substratos e produtos).

Os sistemas que funcionam com a adição de solvente hidrofóbico são muitas vezes adotados porque a presença do solvente aumenta a miscibilidade dos substratos e mantém a camada de água da enzima que é requerida para a manutenção da sua atividade catalítica (KRIEGER et al., 2004; KRISHNA; KARANTH, 2002). Contudo, os solventes podem causar a desnaturação das lipases, o que pode acarretar na baixa produtividade da reação. Além disso, os solventes são tóxicos e inflamáveis e sua utilização resulta em etapas adicionais para separação do produto, que encarece o processo (FORESTI; FERREIRA, 2005).

Sistemas livres de solvente são mais indicados na síntese do biodiesel, pois têm a vantagem de funcionar com altas concentrações de substrato, o que aumenta a produtividade volumétrica e, conseqüentemente, reduz o custo do processo, além de evitar a necessidade de remover o solvente do produto final (QIN et al., 2008). Entretanto, na ausência de solvente, a viscosidade no meio reacional aumenta, dificultando a difusão e mistura dos substratos e, ainda, a atividade e estabilidade das lipases podem ser reduzidas, devido à alta concentração do álcool utilizada no processo (SHIMADA et al., 2002). O metanol ou etanol podem provocar a desnaturação enzimática através da interação com a camada essencial de água que envolve as lipases, causando mudanças na sua conformação cataliticamente ativa (SHIMADA et al., 2002; KAIEDA et al., 2001). Além disso, o álcool pode se ligar reversivelmente ao sítio catalítico das lipases, formando um complexo que impede o acesso do ácido graxo e provoca uma inibição competitiva da enzima (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; YADAV e DEVI, 2004). A adição do álcool em etapas tem sido utilizada como estratégia para minimizar os efeitos de desnaturação ou inibição enzimática causada pelo álcool



(AGUIEIRAS et al., 2014; ZAGO et al., 2014; MADALOZZO et al., 2014; LI et al., 2012).

### 2.3.3 Fatores que afetam a síntese enzimática de ésteres do biodiesel

A síntese enzimática de ésteres do biodiesel é influenciada por fatores como as propriedades da lipase, as técnicas de imobilização das lipases livres ou de células inteiras e os substratos utilizados na reação. Além destes, a catálise enzimática é influenciada pela razão molar entre os substratos e o regime de adição do álcool, pela presença ou não de solventes hidrofóbicos, pelo tipo de reator, pela quantidade de água no meio reacional e pelas condições operacionais do processo (GULDHE et al. 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014).

O aumento da razão molar álcool:ácido graxo pode deslocar a posição de equilíbrio para a formação dos ésteres. Entretanto, como já mencionado, o álcool em excesso pode causar a desnaturação ou a inibição das lipases. Assim, o resultado do aumento da concentração do álcool no meio reacional depende principalmente da estabilidade da lipase. Geralmente, as razões molares variam de 1:1 até 10:1 (álcool:ácidos graxos) nas reações de esterificação que usam lipases (AGUIEIRAS et al., 2014; BOTTON, 2014; TRENTIN et al., 2013; ADACHI et al., 2013; HAMA; KONDO, 2013; SOARES et. al. 2013; ZHONG et al., 2013; LI et al., 2012). Como os álcoois de cadeia curta são comumente utilizados na síntese de biodiesel, é importante encontrar enzimas que se mantenham estáveis a estes álcoois em sistemas livre de solvente (YAN et al., 2014; KODA et al., 2010).

Geralmente a síntese de ésteres do biodiesel pela rota enzimática é realizada em temperaturas entre 30 e 60°C, pois nessa faixa de temperatura a maioria das lipases tem atividade e estabilidade aceitável (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Em temperaturas mais próximas a 60°C, a viscosidade da matéria graxa é reduzida, o que favorece a difusão, a mistura e o fluxo do meio reacional e isso pode aumentar a velocidade da reação (FREEDMAN et al.,

1986). As lipases bacterianas apresentam maior estabilidade térmica do que lipases fúngicas e podem atuar em temperaturas mais elevadas (MARCHETTI et al., 2008).

O controle da quantidade de água no meio também é um fator importante, pois a água atua na manutenção da estrutura ativa das lipases (FORESTI et al., 2007). À medida que se aumenta o teor de água, a reação pode ter seu equilíbrio deslocado no sentido da hidrólise (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005). Entretanto, alguns autores acrescentam água diretamente no meio reacional de esterificação para remover a água formada durante a reação. O sistema se torna bifásico e a água produzida na reação migra para a fase aquosa, o que pode aumentar a velocidade inicial da reação. Uma vez removida a água do meio reacional orgânico, o equilíbrio da reação é deslocado no sentido da síntese (SOARES, 2014; ATADASHI et al., 2012; FORESTI et al., 2007). Também para a remoção de água produzida na esterificação, Botton (2014) e Meng et al. (2011) adicionaram peneira molecular no meio de reação e isso favoreceu o aumento das conversões no processo. Já Watanabe et al. (2007) removeram a água presente no meio reacional com glicerol, que também resultou em um aumento na conversão em ésteres.

#### 2.3.4 Estudos de síntese de ésteres do biodiesel por esterificação enzimática em sistemas livres de solvente

O interesse no uso de lipases para a produção de ésteres que compõem o biodiesel surgiu no início da década passada com trabalhos pioneiros de SHIMADA et al. (2002), ISO et al. (2001) e ABIGOR et al. (2000). Desde então, estudos vêm sendo publicados com uma grande variedade de preparados enzimáticos, como sólidos fermentados, células inteiras de micro-organismos e lipases comerciais ou produzidas em laboratório, imobilizadas em diversos tipos de suportes e com diferentes graus de pureza. Apesar da maioria desses estudos ser de transesterificação, a síntese de ésteres do biodiesel por esterificação pode ser mais vantajosa devido à ausência do glicerol, que é formado na transesterificação. O glicerol forma uma camada hidrofílica na

superfície do suporte que deixa a lipase inacessível aos substratos hidrofóbicos. Além disso, quando as reações são operadas em leito fixo, ocorre o entupimento do leito devido ao acúmulo de glicerol, que tem alta viscosidade (SALUM et al., 2010; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; HAMA et al., 2007; DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; WATANABE et al., 2000; DOSSAT; COMBES; MARTY, 1999).

A Tabela 1 mostra trabalhos recentes sobre a síntese de ésteres alquílicos com lipases em sistemas livres de solvente. Nas reações de esterificação as conversões de ácidos graxos em éster variam de 50 a 98% em tempos de 8 min a 88 h. Os substratos mais comuns são os ácidos graxos do óleo de soja, o ácido oleico e o etanol. O ácido oleico é o mais utilizado devido a sua disponibilidade comercial e por ser um ácido graxo presente em grande quantidade na maioria dos triacilgliceróis.

Destacam-se os trabalhos que utilizaram reatores de leito fixo preenchidos com sólidos fermentados secos de micro-organismos como catalisadores sem qualquer tipo de purificação. Salum et al (2010), aplicaram um SFBL em reações de transesterificação e obtiveram 95% de conversão em 46 h, em reator de leito fixo preenchido com 3 g de SFBL e meio reacional contendo 72 mmol de etanol e 24 mmol de óleo de soja (razão molar 3:1) com vazão de circulação de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ , a  $50^{\circ}\text{C}$ . Já Botton (2014) e Soares et al. (2013) utilizaram sólidos fermentados para catalisar reações de esterificação utilizando como matéria-prima uma mistura de ácidos graxos produzida por hidrólise de *soapstock* em água subcrítica, AGBS e etanol. Botton (2014) relatou uma conversão de 58% em 48 h do processo com 10,8 g de um sólido fermentado por *Rhizopus microsporus* e substratos na razão molar (etanol: AGBS) 10:1. O estudo foi realizado em reator de leito fixo, onde o meio reacional foi bombeado numa vazão de circulação de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , a  $40^{\circ}\text{C}$ . Soares et al. (2013) relataram uma conversão de 92% em 31 h também em reator de leito fixo, preenchido com 12 g de SFBL e meio reacional contendo 1085 mmol de etanol e 361 mmol de AGBS (razão molar 3:1) com vazão de circulação de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , a  $45^{\circ}\text{C}$ .

TABELA 1 - ESTUDOS RECENTES SOBRE A SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM LIPASES EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTE (continua)

	Fonte de lipases	Preparado Enzimático/Suporte	Matéria Graxa	Álcool/ Razão Molar	Conversão/ Tempo	Reator/ Modo	Referência
ESTERIFICAÇÃO	<sup>1</sup> <i>Rhizomucor miehei</i>	Torta de babaçu	<sup>2</sup> AGLs (óleo de macaúba)	Etanol 2:1	91% / 8 h	Frascos agitados / Batelada	AGUIEIRAS et al. (2014)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	<sup>3</sup> SF <sup>4</sup> (BC + nutrientes)	<sup>5</sup> AGBS	Etanol 10:1	86% / 48 h	Frascos agitados / Batelada	BOTTON (2014)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	<sup>3</sup> SF <sup>4</sup> (BC + nutrientes)	Ácido oleico	Etanol 10:1	98% / 48 h	Frascos agitados / Batelada	BOTTON (2014)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	<sup>3</sup> SF <sup>4</sup> (BC + nutrientes)	<sup>5</sup> AGBS	Etanol 10:1	58% / 48 h	Leito Fixo/ Batelada	BOTTON (2014)
	<sup>6</sup> <i>Aspergillus oryzae</i> recombinante	Espuma de poliuretano	<sup>2</sup> AGLs (óleos de palma e soja)	Metanol 1,5:1	90 a 93% / 10 h	Frascos agitados / Batelada	ADACHI et al. (2013)
	<i>Burkholderia lata</i> CPQBA 515-12 DRM 01	<sup>3</sup> SF <sup>7</sup> (BC + FSG)	<sup>5</sup> AGBS	Etanol 3:1	92% / 31 h	Leito Fixo / Batelada	SOARES et al. (2013)
	<i>Burkholderia lata</i> CPQBA 515-12 DRM 01	<sup>3</sup> SF <sup>7</sup> (BC + FSG)	Ácido oleico	Etanol 3:1	82% / 88 h	Frascos agitados / Batelada	SOARES et al. (2013)
	<sup>8</sup> <i>Candida antarctica</i>	Resina aniônica macroporosa	<sup>2</sup> AGLs (óleo de soja)	Etanol 6:1	98% / 8 min	Leito Fixo / <sup>9</sup> Contínuo	TRENTIN et al. (2013)

TABELA 1 - ESTUDOS RECENTES SOBRE A SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM LIPASES EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTE (continua)

	Fonte de lipases	Preparado Enzimático/Suporte	Matéria Graxa	Álcool/ Razão Molar	Conversão/ Tempo	Reator/ Modo	Referência
ESTERIFICAÇÃO	<sup>1</sup> <i>Rhizomucor miehei</i>	Resina aniônica macroporosa	<sup>2</sup> AGLs (óleo de soja)	Etanol 6:1	50% / 8 min	Leito Fixo / <sup>9</sup> Contínuo	TRENTIN et al. (2013)
	<i>Candida sp.</i> 99-125	Membrana Têxtil	Ácido oleico	Etanol 1:1	83% / 24 h	Frascos agitados / Batelada	ZHONG et al. (2013)
	<i>Serratia marcescens</i> YXJ-1002	Células inteiras	<sup>2</sup> AGLs (caixa de gordura)	Metanol 4:1	92% / 72 h	Frascos agitados / Batelada	LI et al. (2012)
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Tecido não tecido	<sup>2</sup> AGLs (óleo de soja)	Etanol 1:1	85% / 3 h	Frascos agitados / Batelada	MENG et al. (2011)
TRANSESTERIFICAÇÃO	<i>Burkholderia sp.</i>	Celite	Óleo de girassol	Metanol 4:1	67% / 60 min	Leito Fixo / <sup>9</sup> Contínuo	TRAN et al. (2014)
	<sup>1</sup> <i>Rhizomucor miehei</i>	Resina de troca iônica macroporosa	Óleo de pinhão manso	Metanol <sup>10</sup> ni	81% / <sup>10</sup> ni	Leito Fixo / Batelada	VENY et al. (2014)
	<sup>11</sup> <i>Aspergillus oryzae</i> recombinante	Espuma de poliuretano	Óleo de soja e canola	Metanol 4,2:1	96% / 14 h	Leito Fixo / Batelada	YOSHIDA et al. (2012)
	<i>Burkholderia sp</i>	Partículas magnéticas	Óleo de oliva	Metanol 4:1	70% / 12 h	Frascos agitados / Batelada	LIU et al. (2012)

TABELA 1 - ESTUDOS RECENTES SOBRE A SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM LIPASES EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTE (conclusão)

	Fonte de lipases	Preparado Enzimático/Suporte	Matéria Graxa	Álcool/ Razão Molar	Conversão/ Tempo	Reator/ Modo	Referência
TRANSESTERIFICAÇÃO	<sup>8</sup> <i>Candida antarctica</i>	Resina acrílica macroporosa	Óleo de soja e canola	Metanol <sup>10</sup> ni	96% / 65 min	Leito Fixo / <sup>9</sup> Contínuo	HAMA et al. (2011)
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Nanopartículas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Óleo de soja	Metanol 4:1	88%/ 136 min	Leito Fixo / <sup>9</sup> Contínuo	WANG et al. (2011)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Sílica porosa	Óleo de soja	Etanol 3:1	70% / 10 h	Frascos agitados / Batelada	RODRIGUES et al (2010)
	<i>Burkholderia lata</i> CPQBA 515-12 DRM 01	<sup>3</sup> SF <sup>7</sup> (BC + FSG)	Óleo de soja	Etanol 3:1	95% / 46 h	Leito Fixo / Batelada	SALUM et al. (2010)
	<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4697	Partículas de biomassa	Óleo de soja	Metanol 1:1	90% / 72 h	Frascos agitados / Batelada	SUN et al. (2010a)

<sup>1</sup>Lipase comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM); <sup>2</sup>AGLs: Ácidos graxos livres; <sup>3</sup>SF: Sólido Fermentado; <sup>4</sup>(BC+ nutrientes): Mistura de bagaço de cana e solução nutritiva; <sup>5</sup>AGBS: Ácidos graxos da borra de soja; <sup>6</sup>*Aspergillus oryzae* expressando lipases de *Candida antarctica*; <sup>7</sup>(BC+FSG): Mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol; <sup>8</sup>Lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozym 435®); <sup>9</sup>Para as reações em modo contínuo, o tempo indicado corresponde ao tempo de residência; <sup>10</sup>ni: não informado pelos autores ou não foi possível calcular com os dados fornecidos; <sup>11</sup>*Aspergillus oryzae* expressando lipases de *Fusarium heterosporum*.

## 2.4 REATORES UTILIZADOS NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DO BIODIESEL

Reatores de tanque agitado (*stirred tank reactors, STR*) e de leito fixo (*packed-bed reactors, PBR*) são os reatores mais estudados na síntese enzimática de biodiesel (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014). Em ambos os reatores, a operação pode ser de forma contínua, descontínua (batelada) ou descontínua alimentada. A principal diferença entre eles está no regime de fluxo do fluido no reator. No *STR*, o meio reacional tende a ser bem misturado, enquanto que no *PBR*, tende a fluir pelo reator no regime de fluxo pistonado.

Os *STRs* são os reatores mais simples e são constituídos por vasos reacionais (tanques ou frascos) e um propulsor, que pode ser um agitador orbital ou mecânico. Este tipo de reator tem sido o mais utilizado em escala laboratorial, devido à simplicidade e à pequena quantidade de reagentes necessária para utilização nessa escala. É adequado para misturas de alta viscosidade, a depender do propulsor e da intensidade da agitação, sendo ideal para lipases imobilizadas, que são menos sensíveis à tensão de cisalhamento e à desnaturação por agitação física (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014; ILLANES; ALTAMIRANO, 2008; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

Os *PBRs* (uma ou mais colunas em série) funcionam no sistema de circulação (batelada) ou com uma única passagem da mistura reacional através do leito (contínuo). O modo de operação em batelada é frequentemente adotado, pois permite longos tempos de contato entre o meio e a enzima imobilizada. Em modo contínuo, o tempo de residência tem que ser suficientemente alto para permitir altas conversões (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014; ILLANES; ALTAMIRANO, 2008; LAUDANI et al., 2007; WATANABE et al., 2001).

A utilização dos *STRs* em maior escala não é indicada devido à baixa produtividade, necessidade de esgotamento, limpeza e abastecimento a cada reação (ILLANES; ALTAMIRANO, 2008; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Já os *PBRs* são os mais indicados para uso com biocatalisadores em meio heterogêneo em escala piloto e industrial, pois, além do menor custo

operacional, esses reatores permitem alta razão de atividade por volume de meio de reação, possibilidade de reutilização da enzima sem a necessidade de separação do meio reacional e minimização dos danos ao biocatalisador devido à menor tensão de cisalhamento (WATANABE et al., 2001). Vale ressaltar que algumas desvantagens no uso dos *PBRs* são relatadas, como a possibilidade de compactação do leito, a formação de caminhos preferenciais e limitações de transferência de massa e calor (WATANABE et al., 2001; LAUDANI et al., 2007; FOMUSO; CORREDIS; AKOH, 2002). Entretanto, medidas podem ser tomadas para contornar esses problemas, como por exemplo, a utilização do fluxo ascendente do meio reacional para evitar a compactação do leito e diminuir os efeitos de transferência de massa (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014).

Uma vez que os *PBRs* são mais indicados para uso em escala industrial, os estudos iniciais de desenvolvimento de processos de síntese de ésteres realizados no laboratório devem ser realizados nesses reatores. Vários autores utilizaram *PBRs* na síntese de ésteres alquílicos por transesterificação e, mais recentemente, por esterificação (Tabela 1). As enzimas utilizadas foram imobilizadas em diversos tipos de suportes (resina acrílica, espuma de poliuretano, partículas magnéticas, entre outros) com diferentes graus de pureza da lipase. Alguns autores utilizaram lipases comerciais como as de *C. antarctica* (Novozym 435<sup>®</sup>) e de *R. miehei* (Lipozyme RM IM) (AGUIEIRAS et al., 2014; TRENTIN et al., 2013; VENY et al., 2014; HAMA et al., 2011). Destacam-se novamente os trabalhos que estudaram *PBRs* preenchidos com sólidos fermentados com atividade lipolítica produzidos a partir de resíduos agroindustriais. Nos trabalhos de Salum et al. (2010), foi utilizada uma coluna de vidro de 10 cm de altura e 1,7 cm de diâmetro interno, com capacidade para 3 g de sólido fermentado. Já Botton (2014) e Soares et al. (2013) utilizaram uma coluna de vidro de 21 cm de altura e 2,7 cm de diâmetro interno, com capacidade para 12 g de sólido fermentado. Nesses estudos, os reatores de leito fixo funcionaram em modo de batelada, como circulação do meio reacional.

Em todos os trabalhos onde foram utilizados reatores de leito fixo operando em modo contínuo, as reações estudadas são de transesterificação, com exceção de Trentin et al. (2013) que foram os únicos a estudar a



esterificação (Tabela 1). Esses autores utilizaram um reator com as dimensões de 2 m de altura e 4,2 mm de diâmetro interno, que foi preenchido com 11 g da lipase comercial Novozym 435<sup>®</sup>. O meio reacional era composto por uma mistura de AGLs de soja, vendida comercialmente, e etanol na razão molar 6:1. A vazão utilizada foi de 2,5 mL min<sup>-1</sup>, com um tempo de residência de aproximadamente 8 min. Durante a reação, o reator foi imerso em um banho de água com ultra-som com potência elétrica de 61,6 W, a 65°C, com o intuito de tornar o meio reacional homogêneo e facilitar a sua dispersão e o contato com as lipases. Foi obtida uma conversão de 98% em ésteres e o sistema foi mantido em funcionamento com essa conversão por aproximadamente 70 min. Ainda nesse trabalho, os autores utilizaram a lipase comercial Lipozyme RM IM no mesmo sistema, onde se observou uma conversão de aproximadamente 50% em 8 min de reação que se manteve estável por 78 min.

A configuração dos *PBRs* é um fator importante, pois possibilita a manipulação do meio reacional entre as colunas, pela adição ou remoção dos seus componentes. Hama et al. (2011) utilizaram cinco colunas em aço inox em série para uma reação de transesterificação com óleo vegetal (soja ou canola) e metanol (Tabela 1). Entre as colunas foram instalados tanques para separação do glicerol. Esse sistema foi eficiente para separação de quase 100% do glicerol formado durante a reação.

O comprimento do *PBR* também é importante, pois grandes comprimentos permitem tempos de residência que são suficientemente altos para obter elevadas conversões. Wang et al. (2011), por exemplo, utilizaram quatro colunas de vidro em série, que juntas tinham capacidade para 544 mL de meio reacional. Cada coluna foi preenchida com 40 g da lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. O meio reacional, formado por óleo de soja:água:metanol:*n*-hexano (razão volumétrica 6:3:1:0,2, respectivamente), foi mantido em um reservatório sob agitação e alimentado na primeira coluna do reator em uma vazão de 0,25 mL min<sup>-1</sup> e, ao final da última coluna, foram obtidos 88% de conversão em éster, com um tempo de residência de 136 min. Essa conversão foi mantida por 192 h de funcionamento do sistema.

## 2.5 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIODIESEL MEDIADA POR LIPASES

Algumas empresas já estabeleceram processos em escala industrial para a produção de biodiesel e a maioria delas fica localizada na China (Tabela 2). Em 2005, a empresa Hunan Rivers Bioengineering, em Hunan, implantou um processo de síntese industrial de biodiesel com capacidade de produção de 20.000 toneladas por ano via transesterificação, com óleo residual de cozinha e o metanol como substratos (TAN; SHANG; ZHANG, 2010; TAN et al., 2010). No ano seguinte, com a lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozym 435<sup>®</sup>) a empresa Hainabaichuan Biologic Engineering, também localizada em Hunan, lançou uma produção enzimática de biodiesel, inicialmente com uma capacidade de produção 20.000 toneladas por ano, que, em 2008, atingiu 40.000 toneladas por ano (TAN; SHANG; ZHANG, 2010; TAN et al., 2010). Em 2007, a LvmingCo. Ltd., em Xangai, estabeleceu uma unidade de produção de biodiesel utilizando a lipase de *Candida* sp. 99-125 imobilizada em membranas têxteis com valor estimado em 0,2 CNY (Yuan Chinês) por kg do biodiesel, o que corresponde à cerca de US\$ 0,03 (dólar dos EUA) por kg do biodiesel. (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014). Mais recentemente, em 2011, a empresa Blue Sun Biodiesel (St. Joseph, Missouri, EUA), desenvolveu um processo de síntese de biodiesel por transesterificação enzimática, com uma lipase comercial não divulgada pela empresa, onde é possível usar praticamente qualquer matéria-prima, sem limite para os ácidos graxos livres (LANE, 2014).

Há ainda outras empresas que atuam no mesmo segmento, como é o caso da Piedmont Biofuels, nos EUA, que desenvolveu uma tecnologia (FAeSTER - *FattyAcideSTERification*) para a síntese contínua de biodiesel com enzima líquida ou imobilizada. Este processo, segundo a empresa, permite utilizar matéria-prima com ácidos graxos livres de até 100% e as enzimas são reutilizáveis durante meses antes da substituição; além disso, o reator é simples, o que permite o uso em espaços já existentes, com pouca ou nenhuma modificação adicional (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBAREET, 2014).

TABELA 2 - EMPRESAS QUE UTILIZAM A CATÁLISE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIODIESEL

Empresa	País	Capacidade de produção (ton/ano)	Fonte de lipases	Material graxo
Hunan Rivers Bioengineering	China	20.000	<sup>1</sup> <i>Candida antarctica</i>	Oleo residual de cozinha
Hainabaichuan Biologic Engineering	China	40.000	<sup>1</sup> <i>Candida antarctica</i>	Oleo de palma
Lvming Co. Ltd.	China	10.000	<sup>2</sup> <i>Candida</i> sp. 99-125	Oleo residual de cozinha
Blue Sun Biodiesel	EUA	<sup>3</sup> 30.000	<sup>4</sup> ne	<sup>5</sup> Sem distinção

<sup>1</sup>Lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozym 435®); <sup>2</sup>Enzima imobilizada em membranas têxteis; <sup>3</sup>A perspectiva da empresa é chegar a mais de 100.000 toneladas de biodiesel até o final de 2015; <sup>4</sup>Os autores não especificaram a fonte da lipase utilizada, informaram somente que a enzima é da empresa Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca); <sup>5</sup>Segundo a empresa, é possível usar praticamente qualquer matéria-prima, sem limite para os ácidos graxos livres.

É necessário ressaltar que, embora haja relatos da síntese enzimática de biodiesel em larga escala, o processo catalisado por lipases na maioria das vezes não consegue competir com o processo químico. Jegannathan, Eng-seng e Ravindra (2011) compararam, do ponto de vista econômico, o processo de produção de biodiesel com catalisadores alcalino e enzimáticos (enzimas livres e imobilizadas). O custo de produção (por tonelada) da síntese de biodiesel com enzimas imobilizadas foi cerca de três vezes superior ao custo da catálise alcalina. O custo da síntese com enzimas livres foi quatro vezes maior do que com a catálise alcalina. A síntese com enzimas imobilizadas foi mais barata em relação à síntese com enzimas livres devido à reutilização do catalisador por cinco ciclos sucessivos de reação (JEGANNATHAN; ENG-SENG; RAVINDRA, 2011). Em outro estudo, Harding et al. (2008) compararam as catálises química e enzimática para a produção de biodiesel e mostraram que a síntese de biodiesel por via enzimática tem vantagem por apresentar um processo simples de purificação do produto final e economia de energia no processo. Além desses aspectos, a reutilização das lipases contribui para um processo ambientalmente correto (HARDING et al., 2008).

Apesar do mercado do biodiesel estar em plena expansão, no Brasil não há produção enzimática de biodiesel. Por isso, trabalhos em maiores escalas utilizando lipases devem ser realizados com o intuito de, em longo prazo, chegar à escala industrial.

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

#### 3.1 JUSTIFICATIVA

Como foi mostrado na revisão bibliográfica, são poucos os exemplos de produção de biodiesel com catálise enzimática em grandes escalas. O processo catalisado por lipases não consegue competir com o processo químico e isso se deve, principalmente, pelo longo tempo das reações e o alto custo das lipases. Soares et al. (2013) desenvolveram um processo de esterificação etílica em reator de leito fixo com a aplicação direta de sólidos fermentados como alternativa para redução dos custos na produção de ésteres do biodiesel. Entretanto, esse estudo foi feito em uma escala reduzida com somente 12 g de sólido fermentado e 125 mL de meio reacional. Para avaliar melhor esse processo é necessário realizá-lo em escalas maiores.

#### 3.2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi de aumentar, em dez vezes, a escala da produção de ésteres etílicos em reator de leito fixo utilizando o sólido fermentado por *Burkholderia lata*, tendo como base o processo desenvolvido por Soares et al. (2013), sendo os objetivos específicos:

- Verificar a conversão obtida numa única passagem do substrato pelo reator já na escala ampliada e investigar a possibilidade de operação no modo contínuo;
- Analisar as variáveis do processo (vazão, número de colunas, remoção de água e adição do etanol em etapas) na utilização do sistema de reatores em série e de vasos reacionais com um sistema de extração da fase aquosa para otimização de desempenho do sistema;
- Estudar a estabilidade e a atividade das lipases contidas no sólido fermentado nas condições experimentais, buscando a reutilização do sólido em ciclos sucessivos de síntese.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos mostrados neste trabalho foram desenvolvidos junto aos Laboratórios de Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) e de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química, ambos vinculados à Universidade Federal do Paraná (UFPR).

### 4.1 MATERIAL, MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES

O biocatalisador utilizado trata-se de um sólido fermentado por *Burkholderia lata* (SFBL) seco, que contém atividade lipolítica, produzido através da fermentação em estado sólido (4.2.3).

Os meios de cultivo utilizados para o crescimento da cepa de *B. lata* foram os meios Luria Ágar (LA) (triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, ágar bacteriológico 15 g L<sup>-1</sup>) e Luria Bertani (LB) (triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>), preparados segundo Sambrook et al. (1989).

Os substratos utilizados para determinar as atividades de hidrólise e esterificação do SFBL foram, respectivamente, azeite de oliva da marca Gallo, com acidez máxima  $\leq 0,50\%$  (Cargill Agrícola S.A., São Paulo, Brasil) e ácido oleico P.A. da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil).

Etanol (99,5%), Metanol (99,8%), *n*-propanol (99,5%), *n*-heptano (99,5%) e *n*-hexano (99,5%) foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). A peneira molecular (3Å, 8-12 mesh) e os padrões cromatográficos com grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

Nas reações de esterificação, foi utilizada a oleína bidestilada da Dipa Química (Curitiba, Paraná, Brasil). Esse material é um produto emoliente, com ampla aplicação industrial na produção de lubrificantes, desengraxantes, plastificantes, bronzeadores, cremes e emulsões e também é muito utilizada

como aditivo em base de sabões e sabonetes. Pela sua vasta aplicação na indústria, a oleína é amplamente disponível comercialmente, sendo obtida principalmente através de resíduos de pré-descarne (carne) bovino (PRIEBE, 2007). Nesse processo, após a separação das impurezas contidas nos resíduos de pré-descarne, a mistura é submetida a uma destilação sob alto vácuo, seguida de separação da estearina por cristalização fracionada, através do abaixamento da temperatura, e, então, passa por uma etapa de hidrólise química para obtenção de um produto com alta concentração de ácidos graxos livres (AGLs). Segundo o fabricante, a oleína que foi utilizada neste trabalho é altamente pura, por ter sido bidestilada e fracionada até se chegar na concentração acima de 95%. Esse produto apresentava aparência líquida (a temperatura ambiente), cor levemente amarelada e odor leve característico. Os demais reagentes tiveram o grau de pureza requerido nos experimentos.

## 4.2 PRODUÇÃO DA LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

### 4.2.1 Micro-organismo e manutenção

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a cepa da bactéria *Burkholderia lata* CPQBA 515-12 DRM 01, isolada no LTEB. A identificação do micro-organismo foi realizada através do sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S, pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), na UNICAMP (Apêndice A). O estoque da cepa foi preservado em meio LB com 40% (v v<sup>-1</sup>) de glicerol a -18°C.

#### 4.2.2 Inóculo

Para a produção do inóculo a ser utilizado na FES, 1 mL da solução estoque foi inoculado em uma placa de Petri que continha o meio LA estéril. A placa foi incubada em estufa bacteriológica a 29°C por 48 h ou até notar-se o crescimento das colônias. Após isso, foi recortado um quadrado com área de aproximadamente 9 mm<sup>2</sup>, que foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, que continha 30 mL de meio LB estéril. Esse frasco foi incubado em agitador orbital a 29°C e 200 rpm até atingir uma absorbância de pelo menos 0,8 a 600 nm, que corresponde a um ponto na fase exponencial de crescimento da bactéria (FERNANDES, 2007).

#### 4.2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

Foram utilizados dois substratos sólidos para a FES: bagaço de cana (BC) e sementes de girassol com casca. O primeiro foi obtido junto à Usina de Álcool Melhoramentos (Jussara, Paraná, Brasil) e o segundo adquirido em comércio local.

Para o preparo desses substratos sólidos, conforme metodologia descrita por Salum (2010), as sementes de girassol foram trituradas em moinho de facas, e tamisadas para obtenção da farinha de sementes de girassol (FSG) com granulometria entre 0,85 e 2,36 mm. O BC foi lavado três vezes com água e seco a 60°C por 24 h, e tamisado para obtenção de partículas com a mesma granulometria da FSG.

Em um procedimento padrão, as fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, que continha 20 g (base seca) da mistura dos substratos sólidos na proporção 1:1 (fração mássica). Os substratos foram umedecidos com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 para atingir a umidade de 75% (fração mássica, base úmida). O teor de umidade foi aferido em balança de infravermelho, conforme descrito em 4.7.1. Os frascos que continham os substratos úmidos foram tampados com tampões de algodão, esterilizados em



autoclave, resfriados e inoculados com 2 mL do meio já descrito em 4.2.2. Uma vez inoculados, os frascos eram incubados em estufa bacteriológica a 29°C por 72 h (SALUM et al., 2010).

Após a fermentação, SFBL foi seco em fluxo de ar, conforme estabelecido por Soares et al. (2013). Nesse sistema, havia dois tubos de cloreto de polivinila (PVC) conectados. O tubo inferior foi preenchido com sílica ativada para a desumidificação do ar e no tubo superior foram acondicionados aproximadamente 200 g de SFBL úmido. Ar proveniente de um compressor foi introduzido na base do tubo inferior em sentido ascendente com fluxo de 20 L min<sup>-1</sup> em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). O ar seco foi então diretamente introduzido na base o tubo superior com o SFBL úmido. No topo do tubo superior, foi conectada uma mangueira para a saída do ar, que foi borbulhado em uma solução de hipoclorito de sódio 10% (v v<sup>-1</sup>) contida em um frasco Erlenmeyer. Durante a secagem, a umidade da sílica foi acompanhada visualmente pela mudança da coloração do indicador da sílica.

#### 4.2.4 Estabilidade do sólido fermentado ao armazenamento

Ao considerar a estabilidade ao armazenamento relatada em estudos anteriores que utilizaram sólidos fermentados de micro-organismos, (AGUIERAS et al., 2014, BOTTON, 2014, SOARES et al., 2013) e que seria necessário utilizar uma grande quantidade de sólido fermentado nesse estudo, foram feitos lotes sucessivos de fermentação. Com o intuito de se obter um único lote com características uniformes, os lotes já secos foram misturados, para formar um grande lote de 2 kg de SFBL, que foi armazenado em sacos plásticos, mantido em refrigerador a 4°C e utilizado diretamente nas reações de esterificação. No início do armazenamento, este lote apresentou uma atividade de hidrólise de 144 U g<sup>-1</sup>SS, atividade de esterificação de 6 U g<sup>-1</sup>SS e umidade de 10%.

A estabilidade de SFBL seco ao armazenamento foi acompanhada durante 9 meses pela determinação da atividade de esterificação (seção 4.7.2.2), verificada a cada trimestre.

#### 4.2.5 Delipidação do sólido fermentado

A delipidação do sólido fermentado foi realizada somente para a determinação da atividade de esterificação (seção 4.7.2.2), com a finalidade de remover os lipídios residuais da FSG utilizada na fermentação (SALUM, 2010) e também para a remoção dos ácidos graxos residuais provenientes das reações de esterificação (quando da aferição da atividade residual de SFBL usado nas reações).

Para esse procedimento, SFBL foi lavado de três a cinco vezes com *n*-hexano, na proporção de 10 mL para cada 1 g de sólido. Em cada lavagem, a mistura foi incubada em agitador orbital por 10 min a 200 rpm e 25°C. Em seguida, o solvente foi retirado por filtração e o sólido retido foi seco em capela de exaustão sobre papel filtro qualitativo. O filtrado foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) (seção 4.7.4), a fim de se verificar a eficácia da delipidação.

### 4.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATORES DE LEITO FIXO

#### 4.3.1 Estudos preliminares

Nos estudos preliminares, as reações de esterificação em leito fixo foram feitas em reatores de bancada, de acordo com Soares et al (2013). O reator utilizado tinha um reservatório de meio reacional (4,4 cm de diâmetro interno e 9,0 cm de altura) e uma coluna de vidro encamisada (2,7 cm de diâmetro interno e 21 cm de altura), preenchida com 12 g de SFBL (base seca) (Figura 3). O reservatório foi abastecido com 100 g de oleína (equivalentes a 354 mmol, considerando a mesma massa molar do ácido oleico de 282 g). Para comparação com os resultados obtidos por Soares et al (2013), em outro experimento, o reservatório foi abastecido com 100 g de ácidos graxos da borra de soja (AGBS) (equivalentes a 361 mmol, considerando massa molar média

de 277 g). Em ambos os casos, a matéria graxa foi misturada com 25 g de etanol (equivalentes a 542,6 mmol), equivalentes a uma razão molar (RM) de 1,5:1.

Para montagem de todas as colunas utilizadas neste trabalho, SFBL foi colocado através de um funil e, então, levemente prensado com o auxílio de um bastão de vidro. Nas extremidades da coluna, foram colocados filtros em tecido de algodão no mesmo diâmetro da coluna, para evitar arraste do sólido fermentado e, então, a coluna era fechada com rolhas de silicone.

Nestes experimentos, após o preenchimento da coluna, a altura do leito de SFBL foi de 16 cm, que correspondia a uma densidade aparente de leito de  $131 \text{ g L}^{-1}$ . O reator operava com circulação de água pela camisa da coluna, para manter a temperatura do meio reacional em  $45^\circ\text{C}$ .

Como estudo preliminar, também foi feito um experimento com um reator maior, composto por um reservatório de meio reacional (7,5 cm de diâmetro interno e 16,5 cm de altura) e uma coluna de vidro encamisada (2,7 cm de diâmetro interno e 65 cm de altura), preenchida com 40 g de SFBL (base seca). O reservatório foi abastecido com 333 g de oleína (equivalentes a 1178,6 mmol), e 82 g de etanol (equivalentes a 1780 mmol), para dar uma RM de 1,5:1. Para essa coluna, a altura do leito foi de 60 cm, que correspondeu a uma densidade aparente de leito de  $116,5 \text{ g L}^{-1}$ .

Nesses ensaios, a relação (SFBL:AGLs) adotada foi de 12% ( $\text{m m}^{-1}$ ) e a razão molar 1,5:1 (etanol:ácido graxo) foi mantida constante. As misturas reacionais (matéria graxa e etanol) foram conservadas no reservatório sem agitação, que formava, no início da reação, um sistema monofásico. Essas misturas foram continuamente circuladas em um fluxo ascendente através da coluna, em uma vazão de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , com o auxílio de uma bomba peristáltica modelo 45MHP10 (Metex Corporation, Buffalo, Nova York, EUA). O esquema da montagem dos reatores pode ser observado na Figura 3.

Durante todas as reações em reatores de leito fixo deste trabalho, alíquotas de 500 mg de amostra do meio reacional foram coletadas e lavadas três vezes com 1 mL de solução saturada de NaCl (para retirada do excesso de etanol). Após lavagem, a fração orgânica (que continha os ésteres) foi transferida para um Eppendorf que continha 50 mg de sulfato de sódio anidro. O Eppendorf foi agitado em vórtex por 20 s e mantido em repouso por 30 min.

Em seguida, o material foi centrifugado a  $5000\times g$  por 5 min e a amostra lavada e seca foi transferida para outro tubo Eppendorf limpo. As conversões em éster foram calculadas a partir dos valores do índice de acidez das amostras lavadas e secas (seção 4.7.6.2). Para corroboração dos resultados, o teor de éster das alíquotas do final das reações também foi avaliado por cromatografia em fase gasosa (GC), conforme descrito em 4.7.7.1.

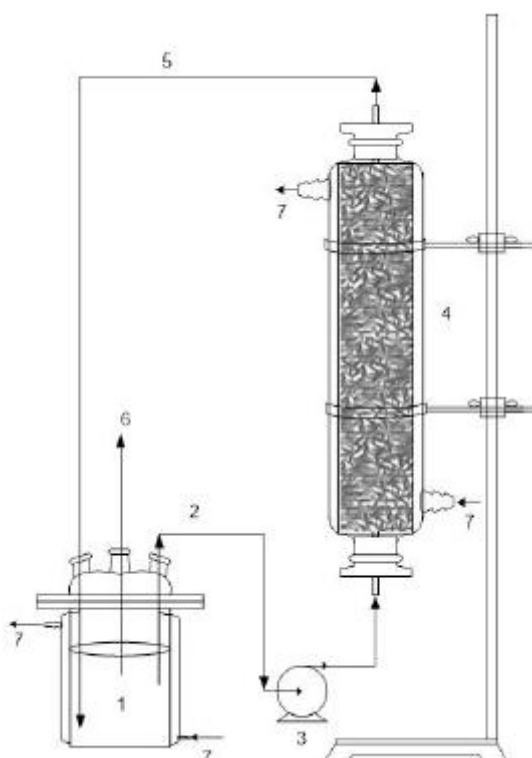


FIGURA 3 - ESQUEMA DO REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO POR *Burkholderia lata*

(1) reservatório contendo meio reacional; (2, 5) meio reacional em circulação; (3) bomba peristáltica; (4) coluna de vidro preenchida com sólido fermentado; (6) amostragem; (7) circulação de água termostatzada.

Fonte: Soares et al. (2013)

#### 4.4 ESTUDOS DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATORES DE LEITO FIXO EM SÉRIE

##### 4.4.1 Síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo em série operando em modo contínuo

A síntese contínua de ésteres etílicos foi executada em um reator de leito fixo, com três colunas idênticas em série (Figura 4). Cada coluna tinha as mesmas dimensões da coluna descrita anteriormente (ou seja, 2,7 cm de diâmetro interno e 65 cm de altura). A altura do reator era, então, de 195 cm e, quando preenchido com 120 g de SFBL (40 g, base seca, em cada coluna), a altura total do leito foi de 180 cm, que correspondia a uma densidade aparente de leito de  $116,5 \text{ g L}^{-1}$ . O reservatório utilizado nesse ensaio tinha dimensões de 16 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura, com capacidade para 3 kg de meio reacional, que foi reabastecido sempre que necessário. O meio reacional era composto por etanol e oleína, misturados na razão molar 3:1 (etanol:oleína) e era bombeado ininterruptamente no reator em fluxo ascendente em uma vazão de  $2,1 \text{ mL min}^{-1}$  com o auxílio da uma bomba peristáltica modelo 45MHP10 (Metex Corporation, Buffalo, Nova York, EUA). O reator operava com circulação de água pela camisa das colunas para manter a temperatura do meio reacional em  $45^{\circ}\text{C}$ .

O meio reacional que saía da coluna era coletado em um reservatório distinto daquele utilizado para acondicionar o meio fresco. Também foram retiradas alíquotas entre as colunas, para verificar a conversão após a passagem em cada coluna (Figura 4).



FIGURA 4 - REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE COM DETALHE DA RETIRADA DAS ALÍQUOTAS ENTRE AS COLUNAS.

Fonte: O autor (2015)

#### 4.4.2 Síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo em série operando em modo de batelada

Para esse experimento, foi montado um reator semelhante ao mostrado na Figura 4, com a diferença que as dimensões do reservatório eram de 8,5 cm de diâmetro interno e 22 cm de altura. Esse reservatório foi abastecido com 400 g oleína (1418 mmol) e 196 g de etanol (4261 mmol) misturados, ou seja, em uma razão molar de 3:1 (etanol:oleína). A mistura reacional foi conservada no reservatório sem agitação, que formava, no início da reação, um sistema monofásico. Essa mistura foi continuamente circulada em um fluxo ascendente através da coluna, em uma vazão de  $2,1 \text{ mL min}^{-1}$ , com o auxílio da bomba peristáltica.

Nesse ensaio, a relação (SFBL:AGLs) foi de 30% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e o reator operava com circulação de água pela camisa das colunas, para manter a temperatura do meio reacional em 45°C.

#### 4.4.3 Reutilização do SFBL em reações de esterificação

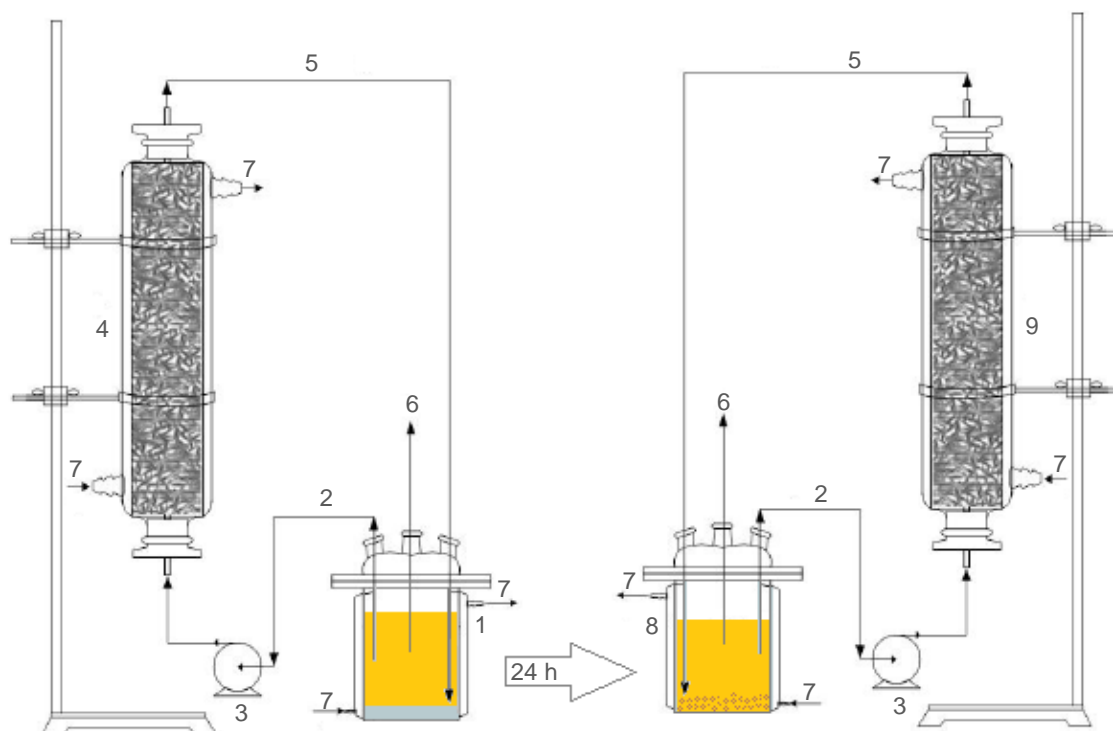
O estudo de reutilização de SFBL foi feito após o primeiro ciclo (48 h) de reação do experimento anterior (4.4.2). Após esse ciclo, a mistura reacional contida no leito fixo foi bombeada em fluxo descendente para o reservatório, com o auxílio da bomba peristáltica, em uma vazão de  $10 \text{ mL min}^{-1}$  durante 60 min. Em seguida, a mistura reacional foi coletada e substituída por um meio reacional fresco. Depois da primeira reação, as conversões subsequentes foram analisadas no início e no fim de cada ciclo (48 h) e foram expressas em percentual absoluto de conversão para cada ciclo.

### 4.5 ESTUDOS DE VARIÁVEIS DO PROCESSO E SEUS EFEITOS NA CONVERSÃO DE ÉSTERES

#### 4.5.1 Influência da razão molar dos substratos nas colunas do reator de leito fixo com duas colunas sequenciais

Para esses ensaios, foi montado um reator com duas colunas sequenciais (Figura 5). Inicialmente, para escolha da melhor RM de trabalho na primeira coluna, o tempo de reação foi de 48 h, com circulação dos substratos somente nesta coluna, que foi preenchida com 40 g de SFBL (base seca). O meio reacional era formado por 333 g de oleína e, em três experimentos distintos, foram adicionados 82, 272 e 544 g de etanol, equivalente às RM (etanol:oleína) de 1,5:1, 5:1 e 10:1, respectivamente, sendo que para valores de RM de 5:1 e 10:1, o volume total do etanol foi dividido por três e adicionado

nos tempos de 0, 6 e 12 h da reação. A temperatura utilizada nos ensaios foi de 45°C e a vazão de circulação dos substratos foi de 5 mL min<sup>-1</sup>.



**FIGURA 5 - ESQUEMA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS**

(1) reservatório contendo meio reacional da primeira coluna (fase orgânica e a fase aquosa formada durante a reação); (2, 5) meio reacional em circulação; (3) bomba peristáltica; (4) primeira coluna de vidro preenchida com sólido fermentado; (6) amostragem; (7) circulação de água termostatizada; (8) reservatório contendo meio reacional da segunda coluna (fase orgânica com 20% (m m<sup>-1</sup>) de peneira molecular); (9) segunda coluna de vidro preenchida com sólido fermentado.

FONTE: adaptado de Soares et al. (2013)

Uma vez decidida a melhor RM de trabalho na primeira coluna, o meio reacional foi circulado por 24 h na primeira coluna e, após esse período, a mistura foi bombeada em fluxo descendente para o reservatório, com o auxílio da bomba peristáltica, em uma vazão de 10 mL min<sup>-1</sup> durante 60 min. A água formada durante a reação e naturalmente decantada no reservatório foi retirada com auxílio de uma pipeta de Pasteur, a fase orgânica foi pesada, adicionada de 20% (fração mássica) de peneira molecular. Em seguida, a amostra foi submetida à dosagem de etanol (seção 4.7.7.2) para permitir o ajuste da razão



molar para o valor desejado e o meio (sistema monofásico) foi posto para circular na segunda coluna por mais 24 h (Figura 5). Os ajustes na razão molar para a segunda coluna foram feitos em três experimentos distintos, nas RM de: 1,8:1 (sem adição do etanol), 4:1 (com adição de 26 g de etanol) e 12:1 (com adição de 135 g de etanol).

#### 4.5.2 Influência da remoção da água por barreira física no reservatório e da agitação do meio reacional nas reações de esterificação

Para esse estudo, foi utilizado um novo reservatório de vidro de 8,5 cm de diâmetro interno e 22 cm de altura que foi dividido em duas partes (Figura 6). Em uma parte, a saída da mangueira, que trazia o meio reacional da coluna, foi colocada no fundo do reservatório, enquanto que a mangueira que captava o meio reacional para a coluna foi colocada na superfície do meio reacional, na outra parte do reservatório. Assim, era possível promover a separação da água formada em um dos lados do reservatório, enquanto que a fase orgânica passava para o outro lado, sob agitação magnética, antes de ser bombeada novamente para dentro do reator (Figura 6).

O ensaio foi feito com uma coluna (2,7 cm de diâmetro interno e 65 cm de altura) com 40 g de SFBL (base seca), 333 g de oleína e 82 g de etanol, (razão molar etanol:oleína, 1,5:1), vazão de circulação 5 mL min<sup>-1</sup>, temperatura 45° C e a reação foi acompanhada por 48 h.

#### 4.6 AUMENTO DE ESCALA DO PROCESSO DE SÍNTESE DE ÉSTERES EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE

O escalonamento da síntese de ésteres etílicos foi feito com um reator de leito fixo, com três colunas em série, com capacidade para 120 g de SFBL (base seca), conforme já descrito na seção 4.4.1 (Figura 4). Nesse ensaio, foi

utilizado o novo reservatório com dimensões de 16 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura, conforme modelo da Figura 6, que foi abastecido com 1245 g de meio reacional composto por 1000 g de oleína (3546 mmol) e 245 g de etanol (5326 mmol), na RM de 1,5:1 (etanol:oleína). O reator operava com circulação de água pelas camisas das colunas para manter a temperatura do meio reacional em 45°C. A fase orgânica do meio reacional foi circulada por 48 h em um fluxo ascendente através da coluna, em uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup>, com auxílio da bomba peristáltica.

Após o primeiro ciclo de reação, a mistura reacional contida no leito fixo foi bombeada em fluxo descendente para o reservatório, com o auxílio da bomba peristáltica, em uma vazão de 10 mL min<sup>-1</sup>, durante 60 min. Em seguida, a mistura reacional foi coletada e substituída por um meio reacional fresco. Depois da primeira reação, as conversões subsequentes foram analisadas no início e no fim de cada ciclo (48 h), e foram expressas em percentual absoluto de conversão para cada ciclo.

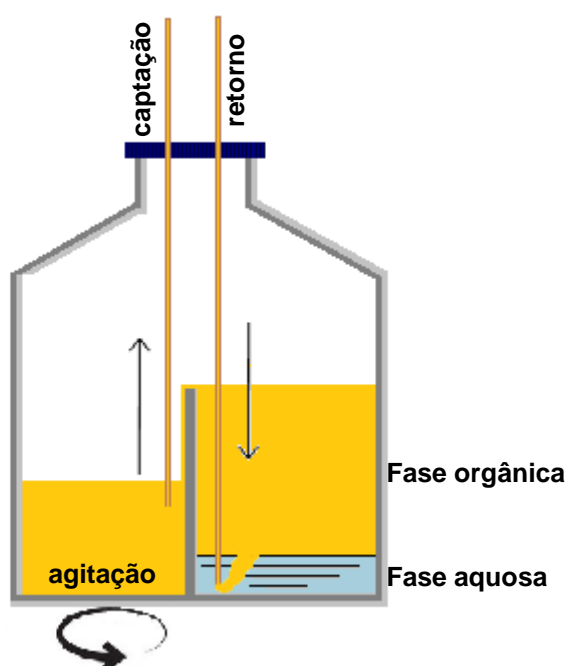


FIGURA 6 - ESQUEMA DO RESERVATÓRIO COM SEPARAÇÃO DA FASE AQUOSA E AGITAÇÃO DA FASE ORGÂNICA

FONTE: O autor (2015)

## 4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.7.1 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade dos substratos sólidos foi determinado em balança de infravermelho (Gehaka IV 2000, São Paulo, Brasil). Para estes ensaios, foi adicionado 1 g de amostra na balança, programada com temperatura de 110°C, em modo de auto-secagem com critério de parada de secagem definido como a variação da umidade menor que 0,05% (fração mássica).

### 4.7.2 Determinação da atividade lipolítica do sólido fermentado

#### 4.7.2.1 Atividade de hidrólise

A dosagem da atividade de hidrólise foi feita com adição de SFBL seco diretamente no meio reacional, pelo método titulométrico em titulador automático do tipo pHStat (Metrohm718 Stat Titrino). Esse método baseia-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir do triacilglicerol utilizado como substrato.

Para os ensaios, foi preparada uma emulsão com água destilada com a adição de Tris-HCl ( $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0),  $\text{CaCl}_2$  ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ), NaCl ( $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ), goma arábica (3%, m/v) e azeite de oliva ( $67 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (TISS; CARRIERE; VERGER, 2001). Essa mistura foi homogeneizada em liquidificador por 15 min e por mais 1 min imediatamente antes do uso. Para cada ensaio, 100 mg de SFBL seco, juntamente com 20 mL da emulsão, foram adicionados em um vaso reacional termostatizado (40°C), sob agitação magnética. O meio reacional foi ajustado automaticamente para pH 7,0 com uma solução de NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) e, então, a reação foi seguida por 5 min. As análises realizadas por esse método foram feitas em triplicata e a atividade

de hidrólise foi calculada com base na velocidade inicial, que corresponde ao coeficiente angular da reta ajustada aos pontos iniciais de um gráfico de volume de NaOH (mL) versus tempo (s).

Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como equivalente a 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos liberados por min, nas condições do ensaio. A atividade lipolítica de hidrólise foi expressa como unidades de atividade por grama de sólido fermentado seco ( $\text{U g}^{-1}\text{SS}$ ).

#### 4.7.2.2 Atividade de esterificação

Para determinação da atividade de esterificação de SFBL seco, adotou-se a síntese do oleato de etila como reação-padrão (FERNANDES et al., 2007). As reações foram realizadas em frascos de vidro de 12 mL hermeticamente fechados com tampas de Teflon que continham 10 mL de meio reacional e 800 a 1000 mg de SFBL delipidado. O meio reacional continha 210  $\text{mmol L}^{-1}$  de etanol e 70  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido oleico (RM de 3:1), solubilizados em *n*-hexano. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 200 rpm, a 45°C. Em intervalos fixos, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram coletadas e analisadas quanto à concentração de ácido graxo residual pelo método colorimétrico de Lowry e Tinsley (1976) (4.7.3). As análises realizadas por esse método foram feitas em triplicata e a atividade de esterificação foi determinada considerando-se a velocidade inicial do consumo do ácido graxo, que corresponde ao coeficiente angular da reta ajustada aos pontos iniciais de um gráfico de concentração de ácido graxo ( $\mu\text{mol}$ ) versus tempo (min).

Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como equivalente a 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos consumidos por min, nas condições do ensaio. A atividade de esterificação foi expressa como unidades de atividade por grama de sólido fermentado seco ( $\text{U g}^{-1}\text{SS}$ ).

#### 4.7.3 Método de Lowry e Tinsley

Esse método foi utilizado para quantificar o teor residual de ácidos graxos durante a determinação da atividade de esterificação. Trata-se de um método que mede a coloração do complexo azul-esverdeado formado entre os íons cobre II e os ácidos graxos livres, que estão presentes na fase orgânica (LOWRY; TINSLEY, 1976).

Para o ensaio, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da amostra em microtubos Eppendorf de 2,5 mL, que continham 1,15 mL de tolueno e 250  $\mu\text{L}$  do reativo de cor (solução aquosa de acetato de cobre II 5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) com pH entre 6,0 e 6,2, corrigido previamente com piridina). O microtubo foi agitado em vórtex durante 40 s e a absorbância da fase orgânica foi lida em espectrofotômetro a 715 nm. A concentração de ácido graxo no meio foi determinada a partir de uma curva de calibração feita previamente com ácido oleico em *n*-hexano, nas mesmas condições do ensaio.

#### 4.7.4 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com os filtrados obtidos na delipidação do sólido fermentado, com a finalidade de verificar a eficácia do método através da confirmação da ausência de ácidos graxos livres e ésteres no sobrenadante das lavagens. Como fase estacionária, foram utilizadas placas de sílica gel (Merck, Darmstadt, Alemanha) e, como fase móvel, uma mistura de *n*-hexano, éter etílico e ácido acético, na proporção volumétrica de 70:29:1. Após a corrida, as placas foram reveladas com iodo. A oleína e seus respectivos etil-ésteres foram utilizados como padrões.

#### 4.7.5 Cromatografia em fase gasosa

O método de cromatografia gasosa (CG) foi utilizado para determinação do perfil de ácidos graxos da oleína e para quantificação dos etil-ésteres e do etanol de amostras provenientes das reações de esterificação.

As análises foram feitas em cromatógrafo de fase gasosa, modelo GC-2010 (ShimadzuCo, Quioto, Japão), equipado com detector de ionização por chama, e coluna capilar Rtx<sup>®</sup>- Wax (Restec, Bellefonte, Pensilvânia, EUA), com 0,32 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 0,25 µm de filme líquido de espessura. Através de um injetor automático modelo AOC-20i (ShimadzuCo, Quioto, Japão), 1 µL das amostras previamente preparadas eram injetadas com razão de *splitting* 1:10, com o nitrogênio como gás de arraste. Os cromatogramas foram registrados e analisados com um *software* da Shimadzu GC Real Time<sup>®</sup> (versão 2.3).

#### 4.7.6 Métodos de análise do substrato das reações de esterificação

##### 4.7.6.1 Determinação do perfil de ácidos graxos da oleína

O perfil de ácidos graxos da oleína, que foi utilizada como substrato modelo neste trabalho, foi determinado através da identificação dos metil-ésteres da amostra, por cromatografia em fase gasosa, baseado no método Ce 1-62 da AOCS (1997).

Para o preparo dos metil-ésteres, foram adicionados em um frasco de vidro com tampa de Teflon, 100 mg da oleína e 5 mL de uma solução metanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (75 mmol L<sup>-1</sup>). A mistura foi mantida sob agitação magnética por 10 min em um banho de água a 80°C. Em seguida, o frasco foi retirado do banho e, após resfriar, foi aberto para a adição de 5 mL de *n*-heptano. O frasco foi agitado manualmente e mantido a 60°C por 5 min. A mistura foi lavada três vezes com 10 mL de solução aquosa saturada de NaCl

(para retirada da solução metanólica). Após lavagem, a fração orgânica (que continha os ésteres) foi filtrada em um papel de filtro qualitativo com sulfato de sódio anidro para a retirada de umidade; 1 µL da amostra foi injetado no cromatógrafo. Na análise, as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250°C. O programa da temperatura da coluna foi 120°C por 2 min, aquecimento a 10°C min<sup>-1</sup> até 180°C, manutenção de 180°C por 3 min, aquecimento a 5°C min<sup>-1</sup> até 230°C, manutenção de 230°C por 15 min, conforme condição indicada pela Norma Européia 14103 (EN, 2003).

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os picos de uma mistura padrão de metil-ésteres Mix FAME37 (Supelco®, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) (Apêndice B). A quantificação dos ácidos graxos foi feita por normalização das áreas obtidas por integração dos picos identificados nos cromatogramas, com a Equação 1:

$$AG(\%) = \frac{A_i}{\sum A} \times 100 \quad (1)$$

onde,

$A_i$  = Área de cada pico de metil-éster;

$\sum A$  = Somatório de todas as áreas dos picos de metil-ésteres.

#### 4.7.6.2 Determinação do índice de acidez e do teor de ácidos graxos livres

Essa metodologia foi empregada não só para quantificar o teor de ácidos graxos livres da oleína bidestilada, mas também para quantificar o teor de ácidos graxos livres residuais durante a síntese de ésteres. Trata-se de uma titulação alcalina baseado no método Ca 5a-40 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 1989).

Para o ensaio, foram pesados, em balança analítica, aproximadamente 100 mg de amostra em um frasco Erlenmeyer de 125 mL. A massa exata foi anotada e, em seguida, foram adicionados à amostra 20 mL de etanol

previamente neutralizado e 2 gotas de solução indicadora (fenolftaleína 1% em etanol,  $\text{m l}^{-1}$ ). Esta mistura foi homogeneizada e titulada com uma solução aquosa de NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) até o ponto de viragem do indicador (coloração rósea permanente por 30 s). O volume foi anotado, e o índice de acidez (IA) e o teor de ácidos graxos livres ( $\text{Teor}_{\text{AGL}}$ ) foram calculados pelas Equações 2 e 3, respectivamente:

$$\text{IA}(\text{mgKOHg}^{-1}) = \frac{V \times [\text{NaOH}] \times f \times \text{MM}_{\text{KOH}}}{m} \quad (2)$$

$$\text{Teor}_{\text{AGL}}(\%) = \frac{V \times [\text{NaOH}] \times f \times \text{MM}_{\text{AGL}} \times 100}{m \times 1000} \quad (3)$$

onde,

V = Volume da solução de hidróxido de sódio consumido na titulação (mL);

[NaOH] = Concentração da solução de NaOH ( $\text{mol L}^{-1}$ );

f = Fator de correção da solução de NaOH padronizada (adimensional);

$\text{MM}_{\text{KOH}}$  = Massa molar de KOH ( $56,11 \text{ g mol}^{-1}$ );

m = Massa da amostra (g);

$\text{MM}_{\text{AGL}}$  = Massa molar de AGL (para a oleína foi utilizado o valor  $282 \text{ g mol}^{-1}$ );

1000 = Fator de conversão de g para mg.

Para os cálculos das conversões em éster (C) das reações de esterificação, utilizou-se a Equação 4:

$$\text{C}(\%) = \frac{(\text{IA}_0 - \text{IA}_t) \times 100}{\text{IA}_0} \quad (4)$$

onde,

$\text{IA}_0$  = Índice de acidez da amostra no tempo zero;

$\text{IA}_t$  = Índice de acidez da amostra no tempo de reação analisado.



#### 4.7.6.3 Determinação do índice de iodo

Na determinação do índice de iodo, foi utilizada a metodologia Cd 1-25 da AOCS (1995). Para isso, foram pesados aproximadamente 500 mg da amostra e esta amostra foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL que continha 20 mL de clorofórmio. Após total solubilização da amostra, foram adicionados 25 mL de uma solução iodo-cloro (segundo Wijs) (Synth, São Paulo, Brasil) sob leve agitação manual. O frasco foi, então, tampado e deixado em repouso no escuro por 1 h e, em seguida, foram adicionados 20 mL de uma solução de iodeto de potássio ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) e 100 mL de água destilada. A mistura foi titulada com uma solução padrão de tiosulfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) até ponto de viragem (desaparecimento total da cor amarela do iodo). Paralelamente, um teste em branco foi realizado com a solução sem a amostra. O índice de iodo ( $I_{I_2}$ ) foi expresso em g de iodo por 100 g da amostra, calculado conforme a Equação 5:

$$I_{I_2} = \frac{(V_B - V_A) \times [Na_2S_2O_3] \times f \times 1,27}{m} \quad (5)$$

onde,

$V_B$  = Volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL);

$V_A$  = Volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

$[Na_2S_2O_3]$  = Concentração da solução de tiosulfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ );

$f$  = Fator de correção da solução de tiosulfato de sódio padronizada (adimensional);

$m$  = Massa da amostra (g);

1,27 = Centiequivalente do iodo (adimensional).

#### 4.7.6.4 Determinação do índice de saponificação

Este ensaio foi realizado com base na metodologia Cd 3-25 da AOCS (1990). Para a análise, foi pesado exatamente 1 g da amostra (base seca) e esta amostra foi transferida para um balão de 250 mL que continha 25 mL de uma solução etanólica de hidróxido de potássio ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Após leve agitação manual para solubilização da amostra, o balão foi acoplado a um condensador de refluxo vertical e mantido em banho de água ( $100^\circ\text{C}$ ) durante 1 h. Após resfriamento do frasco, foram adicionados 40 mL de etanol pelo topo do condensador e 1 mL de solução indicadora de fenolftaleína (1%,  $\text{m v}^{-1}$ ). Esta mistura foi homogeneizada e titulada com uma solução aquosa padronizada de HCl ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), até o ponto de viragem do indicador (desaparecimento total da cor rosa). Paralelamente, um teste em branco foi realizado com a solução sem a amostra. O índice de saponificação (IS) foi expresso em mg de hidróxido de potássio por 1 g de amostra, calculado conforme a Equação 6:

$$\text{IS} = \frac{(V_B - V_A) \times [\text{HCl}] \times f \times \text{MM}_{\text{KOH}}}{m} \quad (6)$$

onde,

$V_B$  = Volume de solução de HCl gasto na titulação do branco (mL);

$V_A$  = Volume de solução de HCl gasto na titulação da amostra (mL);

$[\text{HCl}]$  = Concentração da solução de HCl ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ );

$f$  = Fator de correção da solução de HCl padronizada (adimensional);

$\text{MM}_{\text{KOH}}$  = Massa molar de KOH ( $56,11 \text{ g mol}^{-1}$ );

$m$  = Massa da amostra (g).

#### 4.7.6.5 Determinação do teor de água

O teor de água foi determinado com base no método Ca 2e-84 da AOCS (1997), que se trata de um método coloumétrico por Karl-Fischer. A metodologia consiste na redução do iodo e oxidação do dióxido de enxofre,

com simultâneo consumo de água. Nas análises, foi utilizado um titulador automático, modelo Titroline 7500 (Polimate, SI Analytics, Mainz, Alemanha). Como solução titulante, foi utilizado o reativo de Karl-Fischer (Merck, Darmstadt, Alemanha). Amostras de aproximadamente 50 mg foram pesadas e adicionadas no vaso do titulador que continha 30 mL de metanol seco (Merck). O ponto final da titulação foi detectado pela variação brusca da corrente elétrica e o teor de água (% em massa) foi determinado automaticamente pelo titulador.

#### 4.7.7 Métodos de análise das reações de esterificação

##### 4.7.7.1 Quantificação dos etil-ésteres

A quantificação dos etil-ésteres foi feita por cromatografia gasosa, com padronização interna (padrão heptadecanoato de metila) e externa (Apêndice C).

Para a padronização externa, foi determinado um fator de resposta (FR) do detector para o analito e o padrão interno, com uma mistura de ésteres padrão (oleato, linoleato e palmitato de etila) com 10% (fração mássica, em relação à massa dos ésteres) de heptadecanoato de metila, diluída em *n*-heptano. Em seguida, 1 µL dessa solução foi injetado no cromatógrafo em triplicata nas mesmas condições descritas em 4.7.6.1. As áreas dos picos dos ésteres etílicos foram integradas e o FR foi calculado de acordo com a Equação 7:

$$FR = \frac{A_{PI} \times C_e}{\sum A_e \times C_{PI}} \quad (7)$$

onde,

$A_{PI}$  = Valor da área do pico do padrão interno;

$C_e$  = Concentração dos ésteres na mistura ( $\text{mg mL}^{-1}$ );

$\sum A_e$  = Somatório dos valores das áreas dos picos dos ésteres;

$C_{PI}$  = Concentração do padrão interno na mistura ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

Ao levar em consideração que o FR pode mudar com o tempo e com a manutenção do cromatógrafo, esse procedimento foi repetido imediatamente antes de cada conjunto de análises do teor de ésteres.

Para a quantificação dos etil-ésteres, cerca de 50 mg de amostra com o teor de ésteres desconhecido foi diluído em uma solução do padrão interno (PI) heptadecanoato de metila em *n*-heptano (10 mg mL<sup>-1</sup>). Em seguida, 1 µL da amostra preparada foi injetada no cromatógrafo nas mesmas condições utilizadas para obtenção do FR.

O teor de etil-ésteres na amostra (TEE, % em massa de éster na amostra) foi calculado com a soma das áreas de todos os picos (exceto o pico do solvente e do PI) e relacionando-a com o padrão interno, de acordo com a Equação 8:

$$\text{TEE (\%)} = \frac{\sum A_e}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI}}{C_e} \times 100 \times \text{FR} \quad (8)$$

onde,

$\sum A_e$  = Somatório do valor de todas as áreas dos picos dos ésteres;

$A_{PI}$  = Valor da área do pico do padrão interno;

$C_{PI}$  = Concentração do padrão interno (mg mL<sup>-1</sup>);

$C_e$  = Concentração da amostra (mg mL<sup>-1</sup>);

FR = Fator de resposta calculado previamente.

Esses dados corroboram com o valor de conversão obtido através da análise do índice de acidez já descrito em seção 4.7.6.2.

As reações também foram comparadas em termos de produtividade. As produtividades em éster (PE) foram calculadas com a Equação 9:

$$\text{PE} = \frac{X \times N_{AGL} \times MM_{\text{éster}}}{M_{Sf} \times t} \quad (9)$$

onde,

PE = Produtividade em éster expressa em mg de éster produzido por grama de sólido fermentado (base seca) por hora de reação (mg g<sup>-1</sup>SS h<sup>-1</sup>);

X = Conversão em percentual (por exemplo: para 90% de conversão, foi substituído na fórmula o valor de 0,9);

$N_{AGL}$  = Quantidade de ácidos graxos (mmol);

$MM_{\text{éster}}$  = Massa molar dos ésteres produzidos (g mol<sup>-1</sup>);

$M_{SF}$  = Massa de sólido fermentado (base seca) utilizada na reação (gSS);

$t$  = Tempo de reação no ponto avaliado (h).

#### 4.7.7.2 Quantificação do etanol

A quantificação do etanol foi feita por cromatografia gasosa, com padronização interna (padrão *n*-propanol) e externa (Apêndice D).

Para a padronização externa, foi determinado um fator de resposta (FR) do detector para o analito e o padrão interno, com uma mistura de etanol padrão com 10% de *n*-propanol (fração mássica, em relação à massa do etanol), diluída em acetona. Em seguida, 1  $\mu$ L dessa solução foi injetado no cromatógrafo em triplicata. A temperatura do injetor foi 175°C. O programa da temperatura da coluna foi: 50°C por 6 min, aquecimento a 20°C min<sup>-1</sup> até 250°C, 250°C por 20 min. O FR foi calculado de acordo com a Equação 10:

$$FR = \frac{A_{PI} \times C_e}{A_e \times C_{PI}} \quad (10)$$

onde,

$A_P$  = Valor da área do pico do padrão interno;

$C_e$  = Concentração do etanol na mistura (mg mL<sup>-1</sup>);

$A_e$  = Valor da área do pico do etanol;

$C_{PI}$  = Concentração do padrão interno na mistura (mg mL<sup>-1</sup>).

Ao levar em consideração que o FR pode mudar com o tempo e com a manutenção do cromatógrafo, esse procedimento foi repetido imediatamente antes de cada conjunto de análises do teor de etanol.

Para a análise, cerca de 50 mg de amostra com teor de etanol desconhecido foi diluída em uma solução do padrão interno de *n*-propanol em acetona (10 mg mL<sup>-1</sup>). Em seguida, 1  $\mu$ L da amostra preparada foi injetada no cromatógrafo nas mesmas condições utilizadas para obtenção do FR.

O teor de etanol na amostra (TE, % em massa de etanol na amostra) foi calculado a partir da área do pico do etanol, relacionando com a área do padrão interno *n*-propanol, de acordo com a Equação 11:

$$TE (\%) = \frac{A_e}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI}}{C_e} \times 100 \times FR \quad (11)$$

onde:

$A_e$  = Valor da área do pico do etanol;

$A_{PI}$  = Valor da área do pico do padrão interno;

$C_{PI}$  = Concentração do padrão interno ( $\text{mg mL}^{-1}$ );

$C_e$  = Concentração da amostra ( $\text{mg mL}^{-1}$ );

FR = Fator de resposta calculado previamente.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS AMOSTRAS

Os valores apresentados nos gráficos e tabelas deste trabalho correspondem às médias dos resultados, em duplicata ou triplicata, com o erro padrão da média, calculado pela Equação 12:

$$S_{\bar{x}} = \frac{\sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\sqrt{n}} \quad (12)$$

onde,

$S_{\bar{x}}$  = Erro padrão da média;

$x_i$  = Valor de cada resultado individual ( $x_1, x_2, x_3$ );

$\bar{x}$  = Média aritmética dos valores;

$n$  = Número de amostras.

O tratamento estatístico dos dados foi feito com ferramentas de análise do Excel. Para análise de variância, foi aplicado o teste-F e para definir se a hipótese nula deveria ser rejeitada ou não, foi aplicado o teste-t de *Student*, com nível de confiança de 95%. Desse modo, para amostras que apresentaram valor de  $p > 0,05$ , a hipótese nula não foi rejeitada (não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das amostras comparadas). Caso contrário a hipótese nula foi rejeitada.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO POR *Burkholderia lata*

Lotes independentes de sólido fermentado por *B. lata* (SFBL) foram produzidos e secos (10% de umidade, base seca) nas condições já otimizadas por Soares et al. (2013) (seção 4.2.3) e monitorados quanto as suas atividades de hidrólise (4.7.2.1) e esterificação (4.7.2.2). Obteve-se como resultado uma variação de 120 a 160 U g<sup>-1</sup>SS para hidrólise, e 5,0 a 6,5 U g<sup>-1</sup>SS para esterificação entre os lotes. Assim, esses lotes foram misturados para formação de um único lote, que foi utilizado nos experimentos de síntese de ésteres relatados neste trabalho. O lote teve 144 U g<sup>-1</sup>SS para atividade de hidrólise e 6,0 U g<sup>-1</sup>SS para a atividade de esterificação. Esses valores são compatíveis aos valores apresentados por Soares et al. (2013), que obtiveram atividade de esterificação de 6,3 U g<sup>-1</sup>SS ao utilizar ácido oleico e etanol, para um SFBL preparado de maneira idêntica a este.

#### 5.1.1 Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco durante o armazenamento

Para utilização industrial de um biocatalisador, além da reprodutibilidade nos lotes de fermentação, é necessário que haja estabilidade ao armazenamento. Foi observada uma alta estabilidade do SFBL quando armazenado a 4°C (Figura 7). A atividade de esterificação foi mantida em 6,0 U g<sup>-1</sup>SS durante 9 meses, que confere à esse sólido fermentado viabilidade para uma possível aplicação industrial.

Sólidos fermentados por micro-organismos têm se mostrado bastante estáveis ao armazenamento. Foi relatada a manutenção de 100% da atividade de hidrólise para sólidos fermentados por *B. lata* (armazenado a 4°C) e *Rhizopus microsporus* (armazenado a -18°C), ambos por um período de 12

meses (BOTTON, 2014; SOARES et al., 2013). Também há relatos da manutenção de 100% da atividade inicial por um período de 9 meses de um sólido fermentado por *Rhizomucor miehei* quando armazenado tanto a -20 °C, como a 4°C e em temperatura ambiente (AGUIEIRAS et al., 2014).

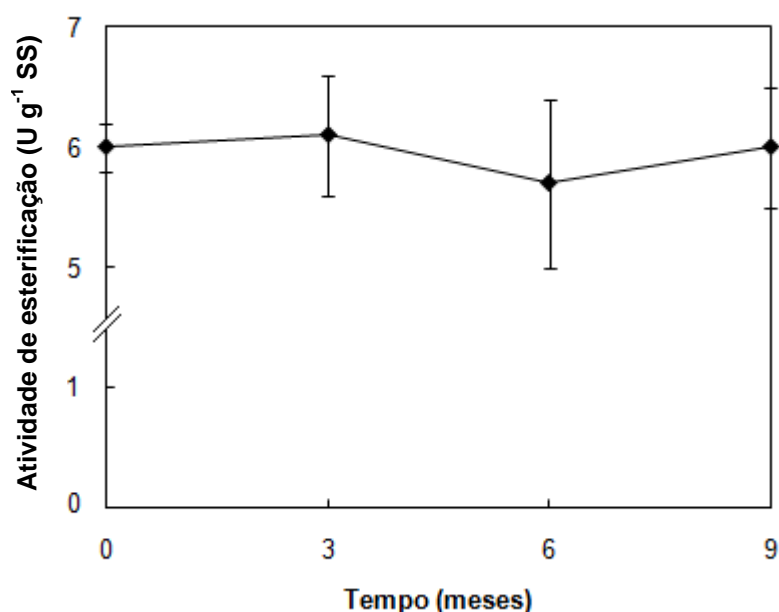


FIGURA 7 - ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO POR *Burkholderia lata* DURANTE O ARMAZENAMENTO A 4°C

Atividade de esterificação: aproximadamente 800 mg de sólido fermentado delipidado, 10 mL de meio reacional (210 mmol L<sup>-1</sup> de etanol e 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico em *n*-hexano), 45°C e 200 rpm. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO PARA AS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

Na produção do biodiesel, a escolha da matéria-prima é um fator decisivo. É necessário levar em conta variáveis como viabilidade econômica, produção e disponibilidade do material de partida. Além dessas questões, a caracterização da matéria-prima é indispensável, posto que suas propriedades químicas e físicas influenciam nas tecnologias de produção empregadas (o tipo de reator e o uso de solventes ou aditivos), no rendimento do processo de



conversão e, principalmente, na qualidade do produto final (RAMOS et al., 2003).

Como substrato modelo para as reações de esterificação apresentadas neste trabalho, foi utilizada a oleína bidestilada. Essa matéria graxa foi escolhida devido à sua representatividade em relação aos principais ácidos graxos de ocorrência natural encontrados em óleos de origem animal e vegetal (Tabela 3) e ainda por sua ampla disponibilidade comercial, posto que para a realização deste trabalho eram necessários grandes volumes de substrato.

Geralmente, para assegurar a viabilidade técnica do material de partida na produção de biodiesel via transesterificação alcalina, são feitas análises de índices de iodo e saponificação, título (ponto de fusão dos ácidos graxos presentes no óleo), e teor de insaponificáveis (componentes que estão no óleo, mas que não formam éster). Esses parâmetros são importantes, pois permitem uma previsão do que se pode esperar do produto final, por exemplo, uma matéria-prima com altos níveis de iodo irá gerar um biodiesel mais vulnerável à oxidação, devido à presença de um grande número de insaturações nos ácidos graxos.

Neste trabalho, para caracterização da oleína, além da análise da composição dos AGLs por CG (seção 4.7.6.1), foram ainda determinados os índices de acidez, de iodo e saponificação e teor de água (Tabela 3). O teor de 99% de ácidos graxos livres na mistura e o baixo teor de água fazem com que a oleína bidestilada seja uma matéria-prima adequada ao processo de esterificação.

O valor do índice de iodo obtido foi de 120 g I<sub>2</sub>/100 g da amostra, o que sugere que a oleína seja uma mistura formada majoritariamente por ácidos graxos insaturados, e isso pode ser confirmado com a análise feita por CG que também apontou o ácido oleico (60,3%) como componente principal. No Brasil, a ANP não estabelece um limite para o índice de iodo no biodiesel. A matéria-prima mais utilizada na indústria brasileira é o óleo de soja que normalmente apresenta um elevado valor para esse parâmetro (em torno de 137 a 143 g I<sub>2</sub>/100 g) (RAMOS et al., 2003). Entretanto, a norma europeia EN 14214 (EUROPEAN STANDARD, 2003) estabelece valores ideais entre 100 e 120 g I<sub>2</sub>/100 g no biodiesel ao levar em consideração que a estabilidade à oxidação e o ponto de entupimento de filtro a frio são parâmetros relacionados ao índice

de iodo. O valor de 120 g I<sub>2</sub>/100 g da oleína aponta que esse substrato irá produzir um biodiesel estável à oxidação e com baixo ponto de entupimento de filtro a frio.

O baixo índice de saponificação da matéria-prima pode apontar impurezas na amostra. Essas impurezas, quando presentes na matéria-prima, provocam uma redução na conversão em ésteres do biodiesel, que pode distanciá-lo dos parâmetros exigidos pelas normas de especificação, além de causar danos aos motores de ciclo diesel, ao formarem depósitos em forma de ceras, carotenóides, e outras moléculas de tamanho maior. O valor de 198 mg KOH g<sup>-1</sup> obtido para o índice de saponificação da oleína é próximo à faixa de 189 a 195 mg KOH g<sup>-1</sup> recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o óleo de soja refinado (BRASIL, 2005), o que indica a ausência de impurezas na oleína usada como substrato neste trabalho.

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO DA OLEÍNA BIDEUTILADA

(% em massa de ácidos graxos)		
Ácido mirístico	C 14:0	1,8 ± 0,1
Ácido palmítico	C 16:0	6,6 ± 0,5
Ácido palmitoleico	C 16:1	3,8 ± 0,1
Ácido esteárico	C 18:0	2,0 ± 0,1
Ácido oleico	C 18:1	60,3 ± 1,5
Ácido linoleico	C 18:2	22,3 ± 0,2
Ácido linolênico	C 18:3	1,2 ± 0,1
Outros ácidos graxos livres		2,0 ± 1,3
AGLs (%)		99
Índice de iodo (g I <sub>2</sub> /100g)		120
Índice de saponificação (mg KOH g <sup>-1</sup> )		198
Teor de água (%)		0,5

Os valores apresentados para os ácidos graxos são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

### 5.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATOR DE LEITO FIXO

#### 5.3.1 Estudos preliminares

Inicialmente, foi feito um experimento para caracterizar a cinética de conversão da oleína em éster em reator de leito fixo. Como controle, foi feito um experimento com o mesmo substrato usado por Soares et al. (2013), a mistura de ácidos graxos produzida por hidrólise de *soapstock* em água subcrítica, AGBS.

Com AGBS e etanol, foi possível alcançar o mesmo resultado relatado por Soares et al. (2013), com uma conversão de 92% em 31 h (Figura 8). No experimento que se utilizou a oleína e etanol, em 30 h, foram convertidos 87% dos ácidos graxos em ésteres, que foi ligeiramente inferior à conversão obtida com AGBS. Com isso, concluiu-se que a oleína poderia ser utilizada como substrato e que provavelmente seria possível aumentar a produtividade do sistema depois de otimizar a reação.

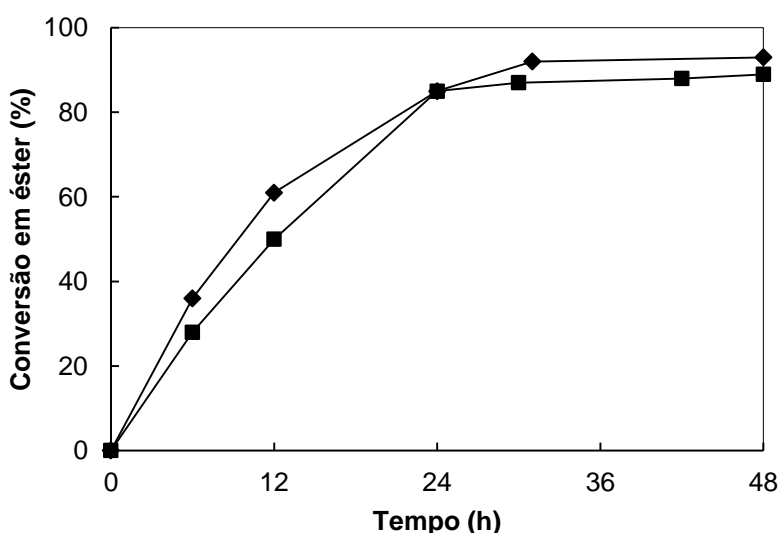


FIGURA 8 - DIFERENTES SUBSTRATOS UTILIZADOS NA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATOR DE LEITO FIXO

Substratos da Reação: (◆) Ácidos graxos da borra de soja (AGBS); (■) Oleína bidestilada. Condições da reação: 12 g de sólido fermentado (base seca), 25 g de etanol e 100 g da matéria graxa, (RM etanol:matéria graxa, 1,5:1), vazão de circulação 5 mL min<sup>-1</sup>, 45°C. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.

Também foi feito um experimento com uma coluna 3,3 vezes maior do que a já utilizada, na tentativa de iniciar o aumento de escala do processo. A coluna foi preenchida com 40 g de SFBL e 415 g de meio reacional (333 g da oleína e 82 g do etanol) foram circulados pela coluna nas mesmas condições do estudo anterior. Observou-se que a coluna maior apresentou o mesmo resultado que a coluna menor, em termos de porcentagem de conversão em éster em função do tempo (Figura 9). Esse é um bom resultado ao levar em consideração que resultados obtidos em processos já otimizados em escala de bancada não se reproduzem facilmente quando se aumenta a escala (BISIO; KABEL, 1985).

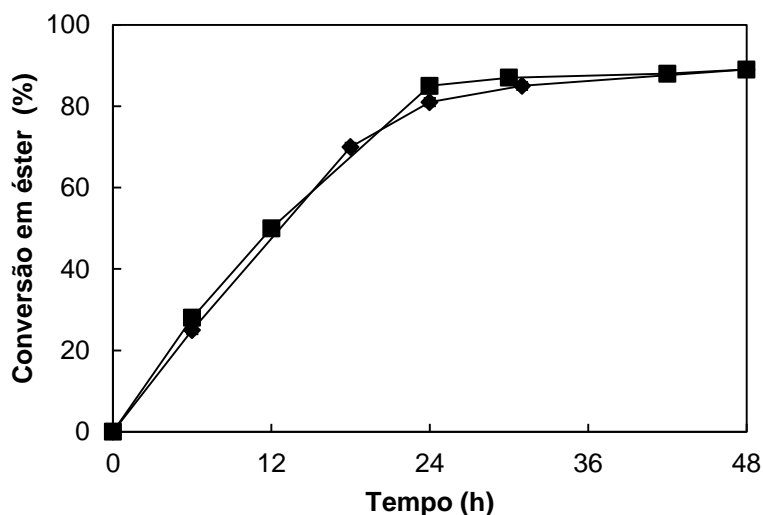


FIGURA 9 - ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATORES DE LEITO FIXO DE DIFERENTES TAMANHOS

Condições da reação: (■) Reator preenchido com 12 g de sólido fermentado (base seca). Meio reacional: 25 g de etanol e 100 g de oleína (mesma curva mostrada na Figura 8); (◆) Reator preenchido com 40 g de sólido fermentado (base seca). Meio reacional: 82 g de etanol e 333 g de oleína. Para ambos os reatores, a RM etanol:oleína foi de 1,5:1, vazão de circulação 5 mL min<sup>-1</sup>, 45°C. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.

Wang et al. (2011) relataram um aumento na conversão com o aumento de escala. Esses autores utilizaram um reator de leito fixo com uma coluna de 1,6 cm de raio interno e 20 cm de altura com capacidade para 40 g de catalisador (lipases de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em nanopartículas

magnéticas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). O meio reacional era composto por óleo de soja:água:metanol:*n*-hexano (razão volumétrica 6:3:1:0,2, respectivamente). O sistema foi operado em modo contínuo e obteve-se 75% de conversão em 34 min (tempo de residência). Quando foi feito outro experimento com quatro colunas em série idênticas às relatadas, nas mesmas condições de reação, obteve-se 88% de conversão em 136 min (tempo de residência nas quatro colunas). Já Botton (2014) e Zago (2010) aumentaram a escala do processo e também modificaram o tipo de reator na escala maior e obtiveram resultados de conversão menores. Zago (2010) relatou uma conversão de 51% em 72 h ao utilizar 1,32 g de um sólido fermentado por *Rhizopus microsporus*, com 15 mL de meio reacional composto por etanol e óleo de milho na razão molar de 3:1, em frascos agitados a 44°C. Quando realizado o experimento em reator de leito fixo, em uma vazão de 2 mL min<sup>-1</sup>, com um aumento para 3 g de sólido fermentado e 46 mL de meio reacional, nas mesmas condições dos frascos agitados, a conversão obtida reduziu para 28% em 120 h. Botton (2014) relatou uma conversão de 86% em 48 h ao utilizar 1,8 g do sólido fermentado por *R. microsporus*, com aproximadamente 22 mL de meio reacional composto por etanol e AGBS na razão molar de 10:1, em frascos agitados a 40°C. Quando realizado o experimento em reator de leito fixo, em uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup>, com um aumento para 10,8 g de sólido fermentado e 133 mL de meio reacional, nas mesmas condições dos frascos agitados, a conversão reduziu para 58% em 48 h.

#### 5.4 ESTUDOS DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATORES DE LEITO FIXO EM SÉRIE

##### 5.4.1 Síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo em série operando em modo contínuo

Inicialmente, com o objetivo de verificar a conversão obtida em uma única passagem do substrato pelo reator e estabelecer um processo contínuo

de síntese de ésteres, em uma escala maior do que as já estudadas, foi montado um reator de leito fixo com três colunas em série (Figura 4, pag 51), com capacidade total de preenchimento de 120 g de SFBL (40 g em cada coluna) (seção 4.4.1).

Apesar de Soares (2014) ter relatado que a melhor razão molar para a síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo, com circulação do meio reacional era de 1,5:1 (etanol:AGLs), decidiu-se aumentar, nesse experimento, a razão molar para 3:1 (etanol:oleína), com o intuito de deslocar a posição do equilíbrio em favor de uma maior porcentagem de conversão. Nos estudos recentes sobre produção contínua de ésteres alquílicos onde foram utilizados reatores de leito fixo com lipases imobilizadas, os autores relataram as melhores conversões em razões molares superiores a 4:1 (álcool:matéria graxa) em reações de esterificação e transesterificação (TRAN et al., 2014; TRENTIN et al., 2013; CHEN et al., 2011; HAMA et al., 2011; WANG et al., 2011). Isso também se deve ao fato de que, em modo contínuo, o meio reacional entra em contato com o catalisador apenas uma vez e, desse modo, o tempo da reação é equivalente ao tempo de residência do meio reacional no interior do reator.

Além da razão molar, a vazão de circulação do meio reacional também foi diferente daquela utilizada nos estudos preliminares. Para o modo contínuo de produção de ésteres, optou-se por reduzir para a menor vazão alcançada pela bomba peristáltica ( $2,1 \text{ mL min}^{-1}$ ), para aumentar o tempo de residência do meio reacional no leito.

O volume de vazio do reator (três colunas juntas) era de  $1030,05 \text{ cm}^3$ . Após preencher as colunas com SFBL, o tempo de residência nas três colunas do reator foi de 233 min. Portanto, as colunas também foram preenchidas com 489,3 mL de meio reacional, o que representa uma porosidade aproximada de 48%.

A Figura 10A mostra o desempenho de cada coluna individualmente. Na primeira passagem do meio reacional, a primeira coluna converteu 21% dos ácidos graxos em ésteres (85 min de tempo de residência). A segunda coluna teve um desempenho semelhante ao converter mais 19% (73 min de tempo residência nesta coluna e, portanto, 158 min na reação). Já a terceira coluna converteu somente mais 6% (75 min de tempo de residência nesta coluna e,

portanto, 233 min na reação). Soares (2014), em um sistema similar a esse, relatou uma sorção<sup>1</sup> de 16 a 20% (fração mássica) da mistura reacional por SFBL já nas primeiras 6 h de reação e, dos componentes presentes na mistura reacional, os hidrofílicos (etanol e água) foram notavelmente mais sorvidos quando comparados com os componentes hidrofóbicos (AGBS e éster). Por exemplo, com um meio reacional com razão molar de 3:1 (etanol:AGBS), foram sorvidos 381 mmol de etanol, mas somente 3 mmol de AGBS em 12 g de SFBL (SOARES, 2014). Desse modo, pode-se sugerir que o desempenho inferior na terceira coluna, obtido nesta primeira passagem, deve-se à baixa concentração de etanol no meio reacional que entrou nesta coluna, pois parte dele foi consumida na reação das duas primeiras colunas e outra parte ficou sorvida no SFBL. Não foi encontrado etanol no meio reacional que saiu da terceira coluna, o que mostra que a reação não tinha como progredir.

Em 6 h de operação, as conversões medidas nas saídas das colunas foram 4%, 8% e 27% para a primeira, segunda e terceira coluna, respectivamente (Figura 10A). Com esses resultados, pode-se inferir que a redução da conversão nas duas primeiras colunas, bem como o aumento de conversão na terceira também estão relacionados à concentração de etanol no meio reacional. A sorção de etanol no sólido fermentado pode ter causado a desnaturação das lipases ao interagir com as suas camadas de solvatação (SHIMADA et al., 2002; TRUBIANO; BORIO; ERRAZU, 2007; KODA et al. 2010). A terceira coluna, por sua vez, ainda mostrava um bom desempenho em relação às outras colunas (27% de conversão) e isso pode ser explicado pelo fato de que, nestas primeiras horas, ela estava protegida da desnaturação por etanol pelas duas colunas anteriores. Uma vez formada a fase sorvida no SFBL contido nas duas primeiras colunas, o sólido parou de sorver etanol e, então, o meio que chegava à terceira coluna em 6 h de operação tinha quantidade de etanol suficiente para a conversão em ésteres.

Ao analisar somente o meio reacional coletado na saída da terceira coluna em relação ao meio fresco que entrava na base da primeira coluna, foi observada uma conversão de 46% em 233 minutos (o tempo de residência nas

---

<sup>1</sup>Sorção é um termo geral que inclui os fenômenos de adsorção e absorção (PERRY; CHILTON, 1973). O sólido fermentado utilizado neste trabalho é um material sorvente com capacidade de absorver o meio reacional, por acúmulo dos componentes por interpenetração no sólido, e adsorver, por acúmulo dos componentes na superfície ou interface.

três colunas), que reduziu para 39% após 6 h de funcionamento do sistema. Em 42 h, a conversão em ésteres na saída da terceira coluna era praticamente nula (Figura 10B).

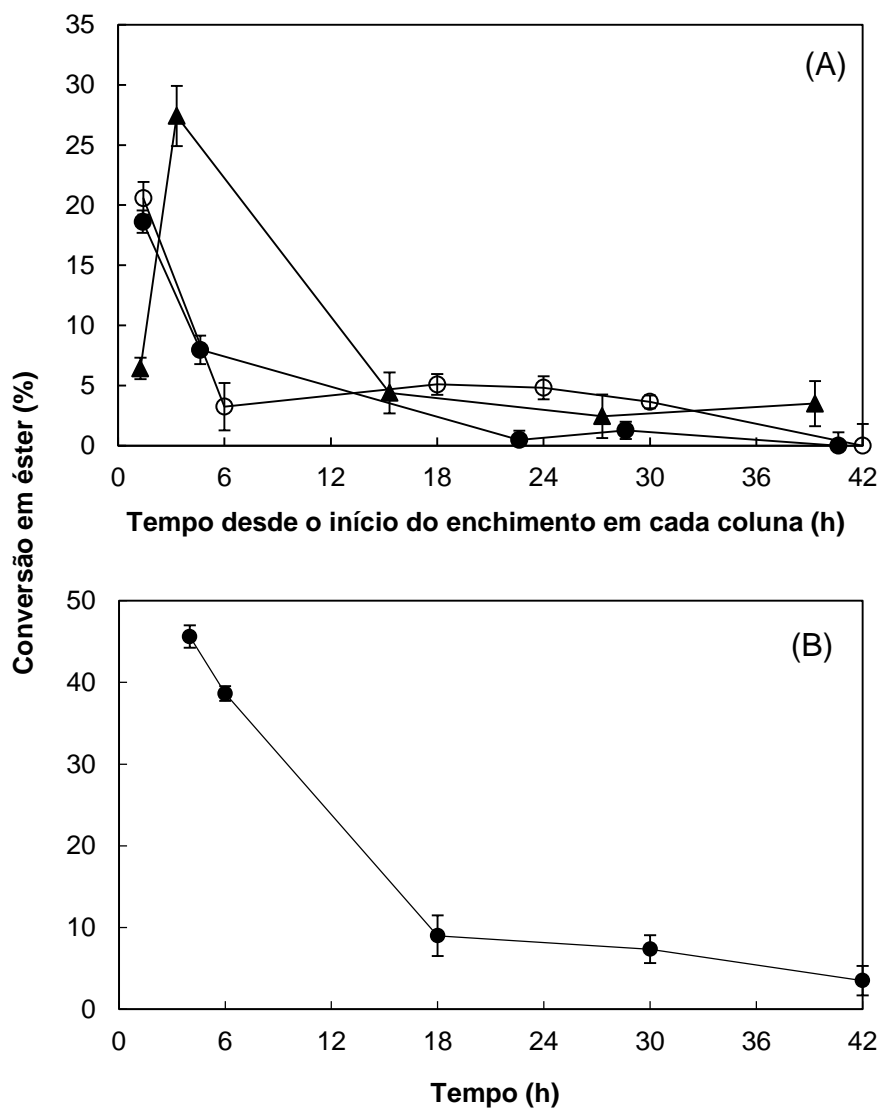


FIGURA 10 - ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE OPERANDO EM MODO CONTÍNUO

(A): O grau de avanço na conversão individual das colunas do reator de leito fixo em série: (○) saída da primeira coluna; (●) saída da segunda coluna; (▲) saída da terceira coluna. (B): Mesma reação exibida na parte (A), com o grau de avanço na conversão entre a entrada (primeira coluna) e a saída (terceira coluna) do meio reacional no reator de leito fixo em série. O primeiro ponto deste gráfico representa o instante em que o meio reacional começou a sair do topo do reator. Condições da reação: 120 g de sólido fermentado (base seca), RM etanol:oleína 3:1, vazão contínua  $2,1 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $45^\circ\text{C}$ . Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.



Para elucidar o motivo da perda da atividade no reator de leito fixo em série, os sólidos fermentados foram retirados das colunas em modo individual, delipidados e analisados quanto às atividades residuais de hidrólise (seção 4.7.2.1) e esterificação (seção 4.7.2.2). Os sólidos fermentados das três colunas não exibiram atividade de esterificação, tampouco de hidrólise. Isso sugere que as lipases foram desnaturadas pelo etanol, uma vez que, no caso de inibição competitiva, o etanol sairia do sítio ativo das lipases para a fase aquosa da reação de hidrólise e a atividade lipolítica seria observada.

Essa é a primeira vez que um sólido fermentado foi usado para catalisar reações de esterificação em reator de leito fixo operando em modo contínuo. A Tabela 4 mostra os resultados de estudos que utilizaram lipases imobilizadas em outros suportes em reatores de leito fixo operando em modo contínuo para a síntese de ésteres alquílicos. O tempo de residência do meio reacional é uma variável de operação bastante discrepante entre esses trabalhos. Halim, Kamaruddin e Fernando (2009) sugerem que tempos de residência muito curtos fazem com que o meio reacional somente passe através do leito, sem interagir com as lipases, o que favorece baixas conversões em ésteres. Já Tepe e Dursun (2008) relatam que tempos de residência muito longos podem causar limitações de transferência de massa. Neste trabalho, o tempo de residência adotado foi o maior possível (233 min), pois foi utilizada a menor vazão da bomba peristáltica ( $2,1 \text{ mL min}^{-1}$ ).

TABELA 4 - ESTUDOS RECENTES QUE UTILIZARAM REATORES DE LEITO FIXO OPERANDO EM MODO CONTÍNUO PARA A SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM CATÁLISE ENZIMÁTICA

Fonte de Lipases	Preparado Enzimático / Suporte	Reação	Material Graxo	Álcool/ Razão molar	Solvente	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Conversão / Tempo de residência	Referência
<i>Burkholderia lata</i>	<sup>1</sup> SFBL <sup>2</sup> (BC + FSG)	Esterificação	Oleína bidestilada	Etanol 3:1	Ausência	2,1	46% / 233 min	Este Trabalho
<sup>3</sup> <i>Candida antarctica</i>	Resina aniônica macroporosa	Esterificação	<sup>4</sup> AGLs de soja	Etanol 6:1	Ausência	2,5	98% / 8 min	Trentin et al. (2013)
<sup>5</sup> <i>Rhizomucor miehei</i>	Resina aniônica macroporosa	Esterificação	<sup>4</sup> AGLs de soja	Etanol 6:1	Ausência	2,5	50% / 8 min	Trentin et al. (2013)
<i>Burkholderia sp.</i> C20	Celite	Transesterificação	Óleo de Girassol	Metanol 4:1	Ausência	0,1	67% / 60 min	Tran et al. (2014)
<sup>3</sup> <i>Candida antarctica</i>	Resina acrílica macroporosa	Transesterificação	Óleo de Soja	Metanol 4:1	<i>tert</i> -butanol	0,1	83% / <sup>6</sup> ni	Chen et al. (2011)
<sup>3</sup> <i>Candida antarctica</i>	Resina acrílica macroporosa	Transesterificação	Óleo de Soja e Canola	Metanol <sup>5</sup> ni	Ausência	9,0	96% / 65 min	Hama et al. (2011)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Nanopartículas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Transesterificação	Óleo de Soja	Metanol 4:1	Ausência	0,25	88% / 136 min	Wang et al. (2011)
<sup>3</sup> <i>Candida antarctica</i>	Resina acrílica macroporosa	Transesterificação	Óleo usado de Palma	Metanol 4:1	<i>tert</i> -butanol	0,57	79% / <sup>6</sup> ni	Halim et al. (2009)

<sup>1</sup>SF: Sólido Fermentado por *B. lata*; <sup>2</sup>(BC+FSG): Mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol; <sup>3</sup>Lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozym 435<sup>®</sup>); <sup>4</sup>AGLs: Mistura de ácidos graxos livres de soja vendida comercialmente; <sup>5</sup>Lipase comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM); <sup>6</sup>ni: não informado pelos autores ou não foi possível calcular com os dados disponibilizados.

#### 5.4.2 Síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo em série operando em modo de batelada

Considerando as baixas conversões obtidas no experimento anterior, foi realizado um experimento no mesmo reator e com as mesmas condições, com a diferença que o meio reacional foi circulado pelas colunas, ou seja, o reator foi operado em batelada (4.4.2).

Tanto nos experimentos realizados preliminarmente (5.3.1), quanto nos experimentos realizados por Soares et al. (2013), a quantidade de SFBL utilizado foi de 12% (razão mássica) em relação ao material graxo. Entretanto, nessa condição, a maior parte do substrato permanece estacionada no reservatório de meio reacional, quando deveria estar em contato com as lipases no reator. Com isso, o meio reacional foi mantido em 596 mL (400 mL de oleína e 196 mL de etanol), pois esse volume era suficiente para conservar o meio reacional no interior da coluna, com um excesso de aproximadamente 100 mL para retirar as alíquotas no reservatório e suprir as tubulações do sistema. Devido a isso, neste experimento, a relação (SFBL:AGLs) passou de 12 para 30%.

A cinética da reação de esterificação neste ensaio teve um perfil semelhante àqueles mostrados anteriormente nos estudos preliminares, obtidos com reatores de 10 e 3 vezes menores que este (Figura 11). Entretanto, houve um aumento na velocidade inicial da reação, com 53% de conversão em éster já nas primeiras 5 h. Por outro lado, em 24 h, a porcentagem de conversão em éster obtida no reator maior (85%) foi semelhante às obtidas nos reatores menores mesmo com o incremento da razão (SFBL:AGLs), de 12 para 30%.

#### 5.4.3 Reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação

A capacidade de reutilização das lipases interfere diretamente na produtividade, e consequentemente no custo da produção de ésteres. Com o

bom desempenho do sistema em relação aos valores de conversão alcançados, foi feito um estudo de reutilização de SFBL durante 5 ciclos sucessivos de 48 h. A conversão de 88% obtida no primeiro ciclo diminuiu para 84% no segundo e chegou ao final do quinto ciclo em 58%, com um total de 240 h de uso do SFBL (Figura 12).

No mesmo sistema, ao mudar o modo de operação de contínuo para batelada, observou-se que o tempo de utilização do SFBL aumentou consideravelmente em um sistema em batelada onde, mesmo após 240 h, o sólido apresentava uma atividade razoável (mais de 50% de conversão em ésteres). Isso ocorre porque as lipases contidas no SFBL desnaturaram mais lentamente durante a operação em batelada.

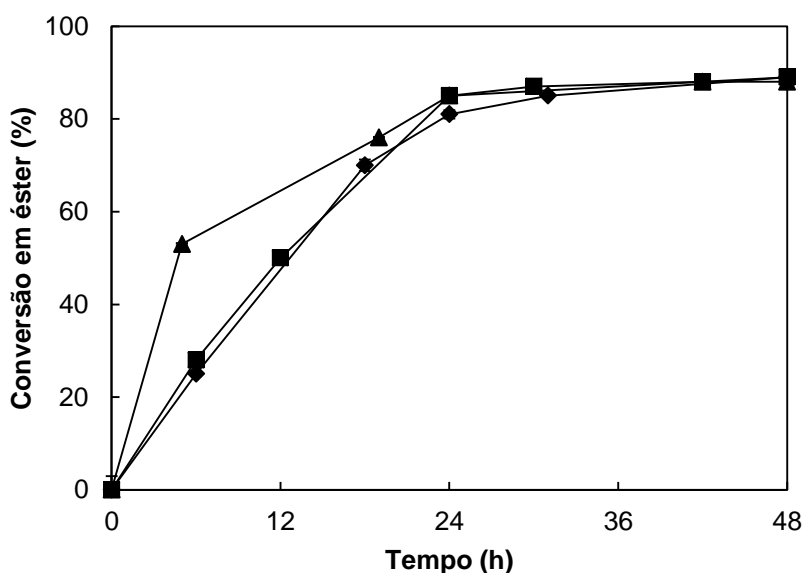


FIGURA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS CINÉTICAS DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM DIFERENTES TAMANHOS DE REATORES DE LEITO FIXO

Condições da reação: (■) Reator preenchido com 12 g de sólido fermentado (base seca), meio reacional contendo 25 g de etanol e 100 g de oleína; (◆) Reator preenchido com 40 g de sólido fermentado (base seca), meio reacional contendo 82 g de etanol e 333 g de oleína. Para ambos os reatores, a RM etanol:oleína foi de 1,5:1, vazão de circulação 5 mL min<sup>-1</sup>, 45°C (mesmas curvas mostradas na Figura 9). (▲) Reator preenchido com 120 g de sólido fermentado (base seca), meio reacional contendo 196 g de etanol e 400 g de oleína (RM etanol:oleína 3:1), vazão de circulação 2,1 mL min<sup>-1</sup>, 45°C. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.

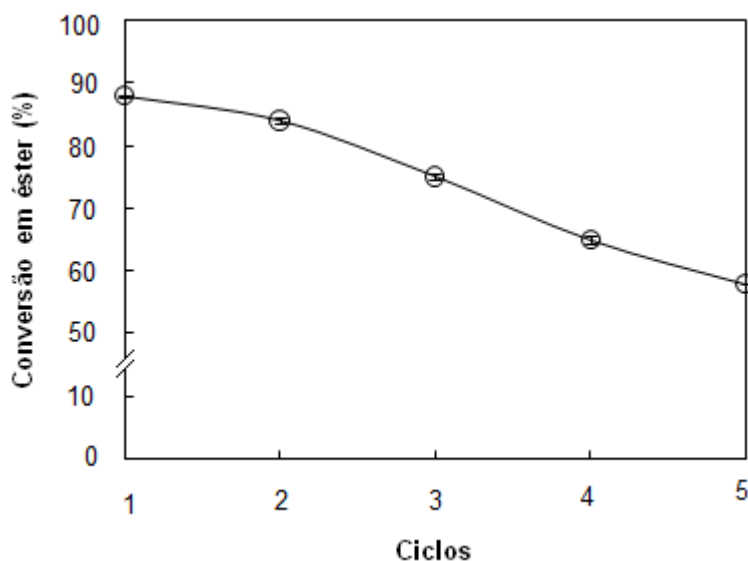


FIGURA 12 - REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO NA ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE

Conversão absoluta para cada ciclo de síntese de 48 h: (○). Condições das reações: 120 g de sólido fermentado (base seca), 196 g de etanol e 400 g de oleína, (RM etanol:oleína, 3:1), vazão de circulação 2 mL min<sup>-1</sup>, 45°C. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.

Estudos de reutilização de sólidos fermentados de micro-organismos do gênero de *Burkholderia* já foram relatados na literatura para reações de esterificação e transesterificação em leito fixo e em frascos agitados (SOARES et al., 2013; LIU et al., 2013; SALUM et al., 2010; FERNANDES, 2007). SFBL utilizado neste trabalho apresentou um resultado compatível com os resultados já descritos. Em sistemas de frascos agitados, com uso de solventes, Fernandes et al. (2007) estudaram a reutilização de um SFBL em reações de esterificação na presença de *n*-heptano. A conversão de 97% obtida no primeiro ciclo foi mantida por 10 ciclos, em um total de 60 h de uso, que diminuiu para 48% de conversão após 84 h (14 ciclos). Nesse estudo de reutilização, observa-se que a conversão, na presença de solvente, obtida no primeiro ciclo da reação foi mantida por um grande número de ciclos quando comparado com o número de reutilizações do SFBL na reação em sistema livre de solventes, obtido neste trabalho. Por outro lado, neste trabalho, o tempo total de uso das lipases com uma conversão razoável (acima de 50%) foi de 240 h, enquanto que o sistema de Fernandes et al. (2007) se manteve razoável

(48%) por 84 h. Em outro estudo, com reator de leito fixo e sistema livre de solvente, Soares et al. (2013) também fizeram a reutilização de SFBL em reações de esterificação e a conversão obtida no primeiro ciclo de 92% foi mantida por 4 ciclos, que diminuiu para 84% após 6 ciclos (288 h) de uso. Nos ensaios de reutilização feitos neste trabalho não foi observada a manutenção da conversão máxima por 4 ciclos de síntese como relatado por Soares et al. (2013).

## 5.5 ESTUDOS DE VARIÁVEIS DO PROCESSO E SEUS EFEITOS NA CONVERSÃO EM ÉSTERES

### 5.5.1 Influência da razão molar dos substratos na primeira coluna do reator de leito fixo com duas colunas sequenciais

A razão estequiométrica da reação de esterificação é 1:1; entretanto, utiliza-se um excesso de álcool a fim de conseguir uma alta velocidade de reação e também maximizar a porcentagem de conversão em éster obtida em equilíbrio (SHIMADA et al., 2002). Todavia, essa técnica implica em custos adicionais com o próprio etanol e de um processo extra para a recuperação desse álcool. Além do mais, o aumento na quantidade de etanol pode envolver maiores despesas de capital por conta do maior tamanho do reator, e ainda as lipases envolvidas no processo podem ser desnaturadas ou inibidas. Em razão disso, uma alternativa interessante consiste no desenvolvimento de reatores em série com estágios, que permitem a mudança do equilíbrio com adição ou remoção dos reagentes e produtos (PORTHA et al., 2012).

Uma vez que foi possível manter os resultados de conversão em escala maior, foi dada continuidade nos estudos na tentativa de reduzir o tempo de reação. Para isso, foi montado um reator de leito fixo com duas colunas sequenciais, com a intenção de adicionar e remover substratos e produtos ao longo da reação, e de investigar a influência da razão molar dos substratos utilizados na esterificação. Esse sistema era formado por duas colunas que

operavam com circulação do meio reacional por 24 h na primeira coluna e mais 24 h na segunda coluna, com um reservatório entre elas, onde era possível adicionar ou remover reagentes e produtos (Figura 5, pag 53, 4.5.1).

Nos primeiros ensaios, onde foi utilizada somente a primeira coluna do reator, variou-se a razão molar (etanol:oleína) em 1,5:1; 5:1 e 10:1, e, nas reações de 5:1 e 10:1, o etanol foi adicionado em 3 etapas (a 0, 6 e 12 h), para minimizar os efeitos do etanol (Figura 13). Em 48 h, as conversões foram 89, 73 e 19% para valores de RM 1,5:1, 5:1 e 10:1, respectivamente. Foram obtidos 89% de conversão para a menor RM, 1,5:1 e as conversões em equilíbrio para as outras RM são maiores do que 89% (Anexo). Mas, experimentalmente, as conversões em ésteres obtidas para RM de 5:1 e 10:1 foram menores do que para RM de 1,5:1. No caso da RM de 10:1, a reação essencialmente parou em 19% de conversão, que indica desativação da enzima. No caso da RM de 5:1, a reação ainda estava em progressão, mas lentamente, o que indicou, no mínimo, inibição pelo etanol. No início da reação (até 6 h), os perfis das reações com valores de RM de 1,5:1 e 5:1 foram semelhantes, pois o volume de etanol adicionado nesse período de tempo foi praticamente o mesmo para ambas as reações. Entretanto, há uma diminuição na velocidade média (entre 6 e 24 h) da reação com RM de 5:1 em relação à de 1,5:1, que é justamente no intervalo de tempo que ocorreu as adições em etapas do etanol. Já a reação com RM de 10:1 teve uma baixa velocidade inicial e média, em comparação com as outras, mesmo com a adição de somente 1/3 do volume total de etanol no início da reação. Essas observações indicam que a adição do etanol em três etapas nas reações com valores de RM de 5:1 e 10:1 não foi eficiente para alcançar a conversão de equilíbrio antes da inibição ou desnaturação das lipases.

Apesar de não alcançar a conversão de equilíbrio no tempo estudado, a adição do etanol em etapas na reação que tinha RM de 5:1 (Figura 13) causou o aumento da conversão para 73% em 48 h em comparação com os resultados de Soares et al. (2013), 60% em 48 h, com a adição do etanol em uma única etapa, e RM de 5:1 (etanol:AGBS), com SFBL. A adição do etanol em etapas pode minimizar os efeitos da desnaturação ou inibição das lipases em uma reação de síntese de ésteres. Madalozzo et al. (2014), ao utilizar lipases recombinantes de *Rhizopus oryzae* para catalisar uma reação de esterificação

que tinha ácido oleico e etanol como substratos, relataram um aumento de 59% de conversão em ésteres quando o etanol foi adicionado em 6 etapas em uma reação com razão molar 1,4:1. Entretanto, também há relatos positivos para reações com altas razões molares, onde o álcool foi adicionado unicamente no início da reação. Botton (2014), por exemplo, obteve uma conversão em ésteres de 98% em 48 h na razão molar 10:1, em uma reação de esterificação, que teve etanol e AGBS como substratos e um sólido fermentado por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM como catalisador. MACEIRAS et al. (2009) também relataram o favorecimento da síntese em uma reação de transesterificação com alta razão molar 25:1 (metanol:óleo de fritura), e lipases de *Candida antarctica*.

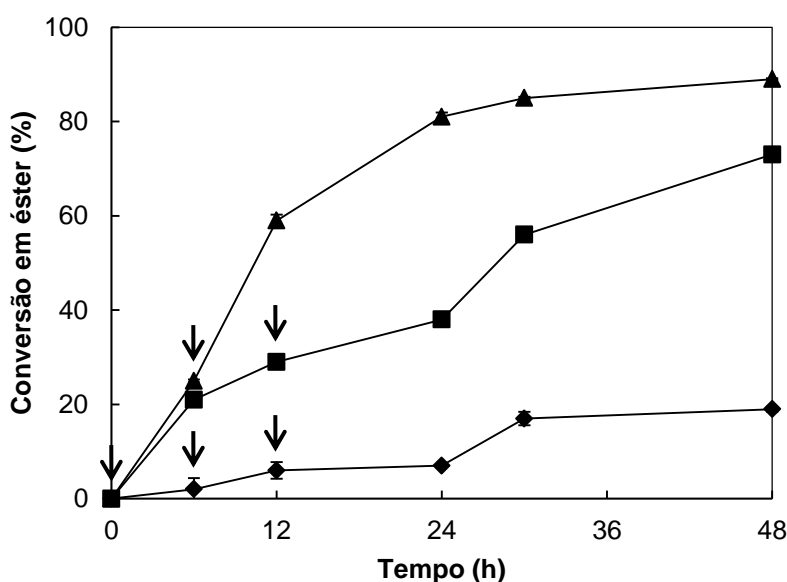


FIGURA 13 - EFEITO DA RAZÃO MOLAR NA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO NA PRIMEIRA COLUNA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS

RM (etanol:oleína): (▲) 1,5:1, (■) 5:1, (◆) 10:1. Condições da reação: 40 g de sólido fermentado (base seca); meio reacional: 333 g de oleína, 82, 272 e 544 g de etanol, equivalente às razões molares (etanol:oleína) de 1,5:1, 5:1 e 10:1, respectivamente, sendo que para as razões molares de 5:1 e 10:1 o volume total do etanol foi dividido por três e adicionado nos tempos de 0, 6 e 12 h (indicados por setas). Vazão de circulação 5 mL min<sup>-1</sup>, 45°C. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.



Para verificar a atividade residual do SFBL usado e também confirmar o motivo das baixas conversões obtidas nas RM de 10:1 e 5:1, os sólidos fermentados foram retirados das colunas após as 48 h da reação, delipidados e avaliados quanto à umidade (4.7.1) e quanto às suas atividades de esterificação (4.7.2.2) (Figura 14).

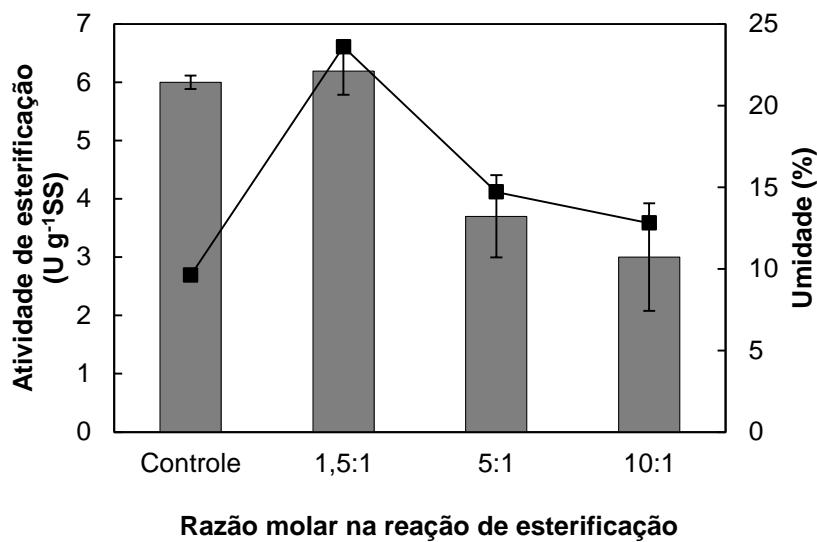


FIGURA 14 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO E TEOR DE UMIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO USADO EM REAÇÕES COM DIFERENTES RAZÕES MOLARES NA PRIMEIRA COLUMA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS

Umidade (■). Atividade de esterificação (colunas): aproximadamente 800 mg de sólido fermentado delipidado (base seca), 10 mL de meio reacional (210 mmol L<sup>-1</sup> de etanol e 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico em *n*-hexano), 45°C e 200 rpm. O controle corresponde ao SFBL seco não utilizado na reação. Os valores apresentados para as atividades de esterificação são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

Com exceção do sólido utilizado na reação com RM de 1,5:1, os outros tiveram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nas atividades de esterificação em relação ao controle (SFBL seco não utilizado na reação). Estes resultados sugerem que o etanol desnaturou as lipases contidas no SFBL utilizados nas reações com valores de RM de 5:1 e 10:1 no reator de leito fixo. Parece improvável que as lipases tenham sido inibidas competitivamente pelo etanol, mesmo na reação com RM de 5:1, pois, nesse caso, o etanol teria sido evaporado junto com o *n*-hexano durante o processo de secagem após a

delipidação e o sólido fermentado usado teria apresentado um valor de atividade de esterificação semelhante ao do controle.

Na Figura 14, observa-se também que o teor de umidade no sólido fermentado usado aumenta com o aumento na conversão; no caso da reação com RM de 1,5:1, o teor de umidade aumentou de 10% no início da reação para 24% ao final das 48 h. A água produzida na reação e sorvida pelo SFBL favorece a quantidade de etanol sorvido, que pode influenciar na conversão de equilíbrio.

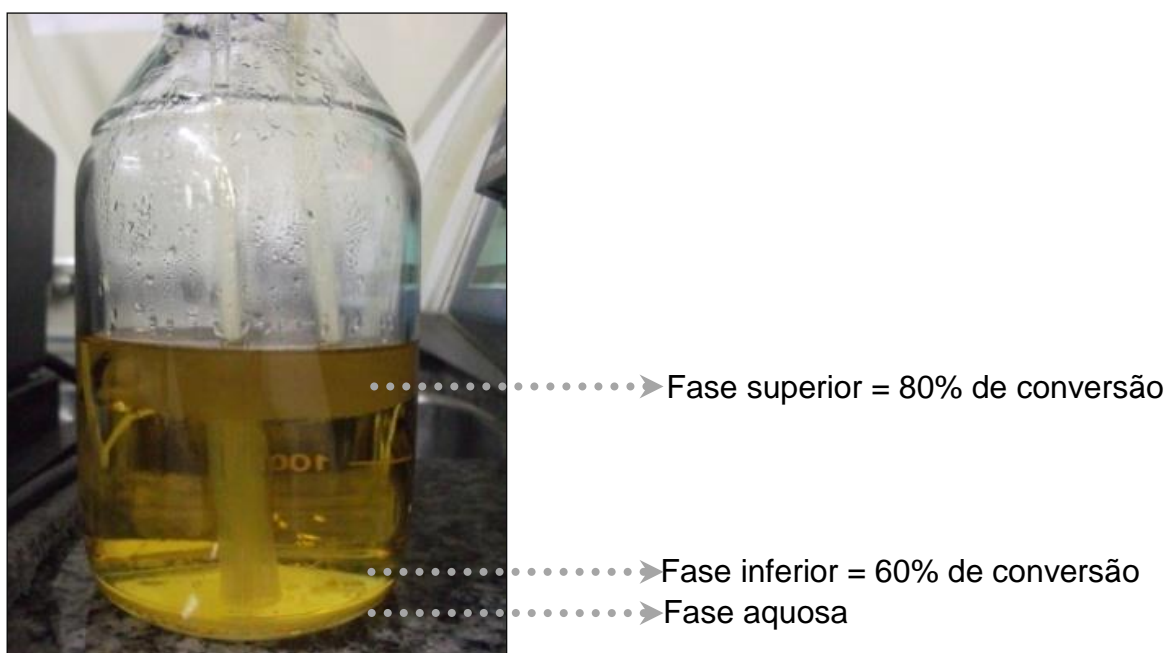
Com esse ensaio, pode-se concluir que o aumento da RM etanol:oleína causa a redução da conversão em ésteres através da desnaturação das lipases. A RM adotada para a primeira coluna foi de 1,5:1 porque proporcionou a maior conversão. Além disso, o uso de uma RM mais baixa pode aumentar a vida útil do SFBL, pois viabiliza a sua reutilização em vários ciclos sucessivos de síntese. Foi decidido, também, que os substratos deveriam circular nesta coluna por 24 h, onde foi observada uma conversão acima de 80% e, então, o meio reacional deveria passar para a segunda coluna do reator de leito fixo.

#### 5.5.2 Influência da razão molar dos substratos na segunda coluna do reator de leito fixo com duas colunas sequenciais

Para investigar a influência da RM na segunda coluna do reator, ao sair da primeira coluna, a mistura reacional era analisada quanto aos teores de ácidos graxos livres, etanol e ésteres formados. A água produzida, que era decantada naturalmente no fundo do reservatório, era removida e a razão molar etanol:oleína era ajustada para o valor desejado. Após isso, a mistura reacional era posta para circular na segunda coluna do reator de leito fixo (Figura 5, pag 53), conforme já descrito na seção 4.5.1.

Nessa parte do trabalho, ao remover a água formada e agitar manualmente o meio, para ajustar a RM ao final de 24 h, foi percebido que o valor de conversão obtido no meio reacional após homogeneização era diferente daquele obtido antes da agitação (quando a amostra era coletada na superfície do meio reacional). Para determinar a causa da discrepância nos

valores de conversão, em um novo ensaio, foram feitas coletas em diferentes pontos do reservatório antes da agitação, a saber: na superfície, onde sempre eram feitas as coletas e na base, no limite com a fase aquosa. Na superfície, havia cerca de 80% de conversão e na base do meio reacional, a conversão era de aproximadamente 60%; por isso, quando se agitava o reservatório, a conversão total diminuía para 70% (Figura 15).



**FIGURA 15 - SEPARAÇÃO DE FASES E DISTRIBUIÇÃO DA CONVERSÃO NO RESERVATÓRIO DE MEIO REACIONAL.**

Meio reacional oriundo da primeira coluna após 24 h de reação. Condições: 40 g de sólido fermentado (base seca), meio reacional composto por 333 g de oleína e 82 g de etanol, RM (etanol:oleína) 1,5:1, vazão de circulação  $5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $45^\circ\text{C}$ .

FONTE: O autor (2015)

Mesmo com a retirada da fase aquosa, que se encontrava naturalmente decantada no reservatório e com a agitação do meio reacional, ainda eram observadas gotículas de água misturadas na fase orgânica e, por isso, foram adicionados 20% de peneira molecular (fração mássica, em relação à fase orgânica do meio reacional). Desta maneira, a peneira molecular absorveu as gotículas de água e o meio reacional que foi alimentado na segunda coluna era composto somente por uma fase orgânica, cuja composição em ésteres era de

70%. Em experimentos distintos, o etanol foi adicionado para levar a RM (etanol:oleína) para dois valores diferentes e em outro experimento, o etanol não foi adicionado (Figura 16). Dentre os valores de RM estudados na segunda coluna, a RM que não foi ajustada por adição do etanol foi de 1,8:1, o que indica que a RM aumentou após 24 h de reação na primeira coluna. Isso ocorreu provavelmente devido ao fato do etanol ter sido colocado em excesso na primeira coluna (1,5:1); assim sendo, proporcionalmente mais AGLs foram consumidos pela reação do que o etanol, que foi removido da fase orgânica pelos mecanismos de sorção no SFBL e remoção pela fase aquosa.

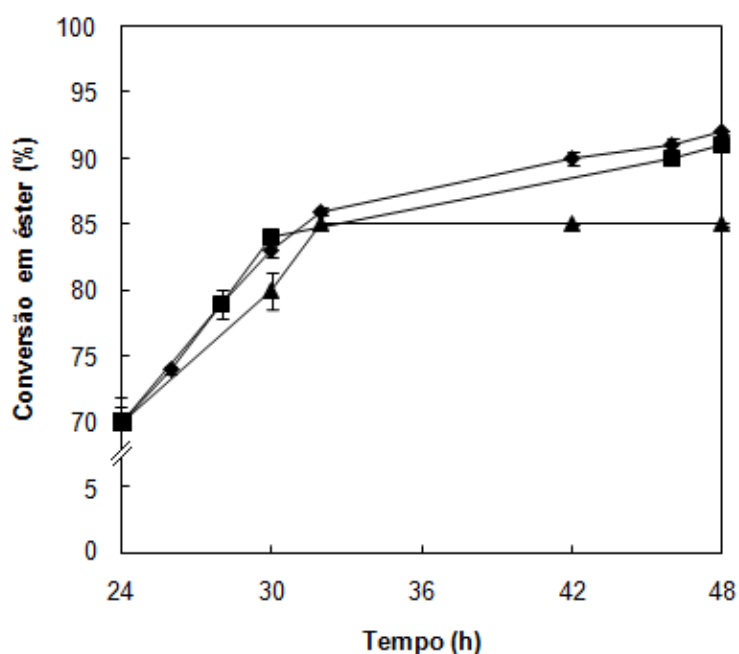


FIGURA 16 - EFEITO DA RAZÃO MOLAR NA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO NA SEGUNDA COLUNA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS

RM etanol:oleína (quantidade de etanol adicionada ao meio reacional oriundo da primeira coluna): (■) 1,8:1 (0 g); (◆) 4:1 (26 g); (▲) 12:1 (133 g). Em todos os casos, foi adicionado 20% de peneira molecular 3Å em relação à massa do meio. Condições da reação: Vazão de circulação 5 mL min<sup>-1</sup>, 45°C. O tempo inicial neste gráfico (24 h) representa o tempo onde o meio reacional saiu da primeira coluna com 70% de conversão em ésteres. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.

De modo análogo ao que acontece na primeira coluna, nas primeiras 6 h de circulação pela segunda coluna, as reações progrediram rapidamente e

depois desaceleraram. Os melhores resultados foram obtidos para as reações com RM mais baixas, ou seja, 1,8:1 e 4:1, onde foram obtidos 14% adicionais de conversão em 6 h de circulação pela segunda coluna, que corresponde ao total de 84% de conversão em 30 h do processo. Ao final de 48 h, foram obtidos 91% de conversão para a reação com RM de 1,8:1 e 92% de conversão para a reação com RM de 4:1. Os resultados sugerem a ocorrência de inibição por etanol para a RM de 12:1, considerando que a conversão de equilíbrio teórica para essa RM é 97% (Anexo).

Após esses experimentos (24 h), os sólidos usados foram removidos das colunas e tiveram suas umidades (seção 4.7.1) e atividades de esterificação (seção 4.7.2.2) determinadas (Figura 17). Esses ensaios foram realizados para comparar a atividade residual dos sólidos fermentados utilizados na primeira e segunda coluna deste reator.

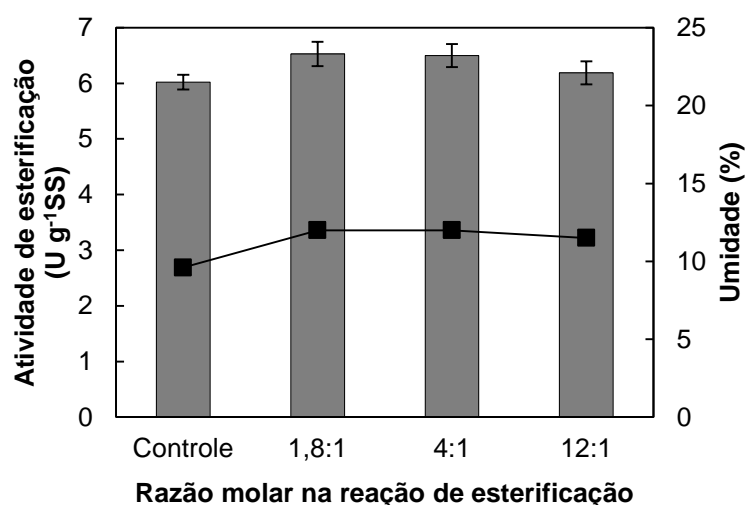


FIGURA 17 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO E TEOR DE UMIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO USADO EM REAÇÕES COM DIFERENTES RAZÕES MOLARES NA SEGUNDA COLUNA DO REATOR DE LEITO FIXO COM DUAS COLUNAS SEQUENCIAIS

Umidade (■). Atividade de esterificação (colunas): aproximadamente 800 mg de sólido fermentado delipidado (base seca), 10 mL de meio reacional (210 mmol L<sup>-1</sup> de etanol e 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico em *n*-hexano), 45°C e 200 rpm. O controle corresponde ao SFBL seco não utilizado na reação. Os valores apresentados para as atividades de esterificação são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

Na segunda coluna do reator (Figura 17), os teores de umidade de SFBL usados foram menores do que os usados na primeira coluna. Na segunda

coluna a produção de água é menor devido às baixas conversões (21 e 22% de conversão para as razões molares 1,8:1 e 4:1 em 24 h, respectivamente).

A Figura 17 também mostra que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre as atividades de esterificação dos sólidos fermentados usados em reações com diferentes razões molares, o que mostra que, na segunda coluna, não há desnaturação pelo etanol mesmo na RM mais alta (12:1). Isto pode ter ocorrido porque a quantidade absoluta de etanol percolada pela coluna era menor, pois para a correção dos valores de RM, o teor de etanol foi calculado com base no teor de ácidos graxos residuais oriundos da primeira coluna.

Ao analisar os resultados já obtidos nos reatores preenchidos com 12, 40 e 120 g de SFBL, mostrados anteriormente, que exibiram mais de 80% de conversão em 24 h, parece, à primeira vista, que os resultados obtidos com o reator de leito fixo com duas colunas sequenciais são inferiores, pois se chegou praticamente aos mesmos valores de conversão em um mesmo tempo de reação e com mais etapas de processo, como a adequação dos valores de RM a partir da dosagem do etanol e a remoção da água por adição de peneira molecular. Entretanto, no reator de leito fixo com duas colunas sequenciais, o meio reacional que entra na segunda coluna é um meio homogêneo, com 70% de ésteres, livre de água, enquanto que os outros resultados correspondiam aos valores de conversão obtidos pelas alíquotas retiradas na superfície do meio reacional contido no reservatório, que não são representativas de todo o meio reacional, como já mostrado na Figura 15. Portanto, os resultados de conversão em éster obtidos com o reator de leito fixo com duas colunas sequenciais representam a conversão em toda a fase orgânica, enquanto que nos experimentos mostrados anteriormente, deve-se descontar aproximadamente 10% dos valores nas conversões relatadas.

Os autores que utilizaram reatores de leito fixo em reações de esterificação catalisadas por lipases relatam que as amostras analisadas são coletadas na superfície da mistura, contida no reservatório de meio reacional ou não informam o ponto exato da coleta (BOTTON, 2014; SOARES et al., 2013; TRENTIN et al., 2013). Isso gera dúvidas em relação aos valores de conversão relatados uma vez que eles podem não ser reais, pois foram obtidos com amostras coletadas em pontos isolados nos reservatórios de meio

reacional, que não representam a conversão verdadeira. Também, por conta disso, os valores de produtividade calculados para esses sistemas podem estar superestimados.

### 5.5.3 Influência da remoção da água por barreira física no reservatório e agitação do meio reacional nas reações de esterificação

Considerando que o meio reacional contido no reservatório da primeira coluna do reator torna-se heterogêneo com o progresso da reação e que a retirada da água favorece a conversão, foi confeccionado um novo reservatório de meio reacional onde era possível separar a fase aquosa por barreira física, ao mesmo tempo em que a fase orgânica era agitada constantemente para se obter uma mistura homogênea de todos os componentes presentes nessa fase (Figura 6, pag 55, 4.5.2).

Inicialmente, esse reservatório foi acoplado a um reator de leito fixo com uma coluna, com capacidade para 40 g de sólido fermentado (base seca) semelhante ao já utilizado nos estudos preliminares (5.3.1). O meio reacional fresco era formado por 333 g de oleína e 82 g de etanol (RM 1,5:1). Para comparação dos resultados, foi apresentado o perfil de uma reação na qual foi usado um reservatório comum, sem a separação da fase aquosa e agitação da fase orgânica (Figura 18).

Neste ensaio, observou-se uma conversão de 86% em éster em 24 h, quando foi utilizado reservatório com barreira física de remoção de água, enquanto que no ensaio realizado com o reservatório comum, a conversão em ésteres em 24 h foi de 81%, com diferença estatisticamente significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ). O uso do novo reservatório melhorou a conversão em ésteres e, além disso, a agitação tornou o meio homogêneo, o que significa que a conversão obtida em uma amostra, independente do ponto de coleta, representa a conversão de toda a fase orgânica contida no reservatório de meio reacional.

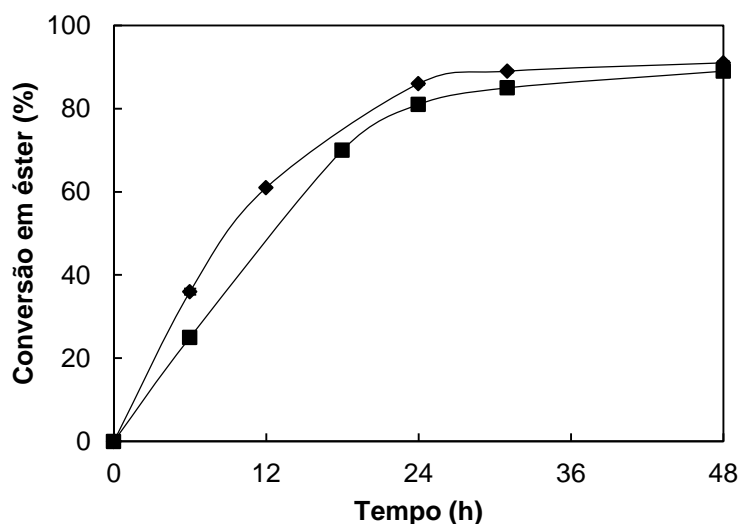


FIGURA 18 - INFLUÊNCIA DA REMOÇÃO DA FASE AQUOSA POR BARREIRA FÍSICA NO RESERVATÓRIO DE MEIO REACIONAL E AGITAÇÃO DA FASE ORGÂNICA NA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATOR DE LEITO FIXO

(♦) Meio reacional com agitação e separação da fase aquosa; (■) Meio reacional sem agitação (mesma curva mostrada na Figura 9). Condições das reações: 40 g de sólido fermentado (base seca), 82 g de etanol e 333 g de oleína, (RM de 1,5:1), vazão de circulação  $5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ . Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.

## 5.6 AUMENTO DE ESCALA DO PROCESSO DE SÍNTESE DE ÉSTERES EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE

Considerando o aumento na conversão obtida com a utilização do reservatório de meio reacional com barreira física para remoção de água, foi testado o uso deste em um reator de leito fixo com três colunas em série (Figura 4, pag 51). Nesse ensaio, foram utilizados 1000 g de oleína e 120 g de SFBL, para aumentar em dez vezes a escala do processo desenvolvido por Soares et al. (2013) (seção 4.6). Para comparação, foi apresentado o perfil de duas reações realizadas nas mesmas condições, nas quais foram utilizados reatores de leito fixo preenchidos com 12 e 40 g de SFBL com 100 e 333 g de oleína, respectivamente, que são 3 e 10 vezes menores do que o utilizado neste ensaio (Figura 19).



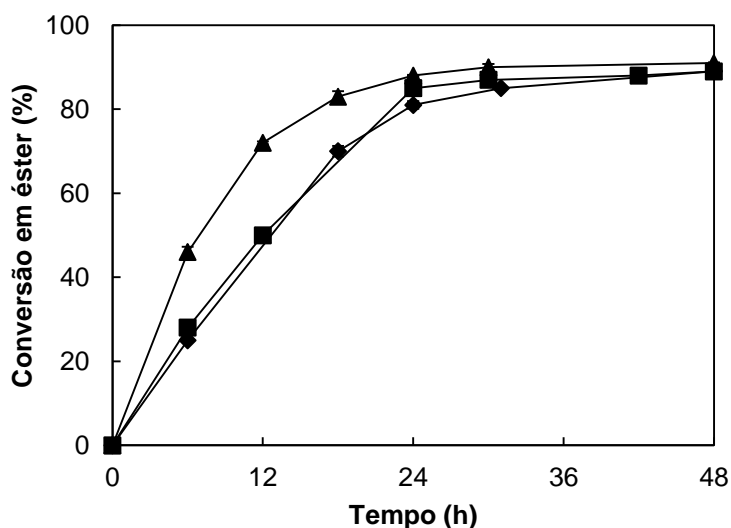


FIGURA 19 - ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO EM REATORES DE LEITO FIXO DE DIFERENTES TAMANHOS

Condições da reação: (■) Reator preenchido com 12 g de sólido fermentado (base seca) e meio reacional contendo 25 g de etanol e 100 g de oleína; (◆) Reator preenchido com 40 g de sólido fermentado (base seca) e meio reacional contendo 82 g de etanol e 333 g de oleína (mesmas curvas mostradas na Figura 9); (▲) Reator preenchido com 120 g de sólido fermentado (base seca) e meio reacional contendo 245 g de etanol e 1000 g de oleína. Para todos os reatores, foram utilizados RM de 1,5:1, vazão de circulação  $5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ . Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.

Os reatores 3 e 10 vezes menores apresentaram perfis semelhantes de conversão em éster em função do tempo (Figura 19). Todavia, foi observado um aumento na velocidade inicial da reação no reator preenchido com 120 g de SFBL, onde foi acoplado o reservatório com barreira física. Além disso, as conversões analisadas nesse ultimo ensaio representam as conversões reais em toda a fase orgânica contida no meio reacional. Foi alcançada uma conversão de 72% já nas primeiras 12 h do processo, que se elevou para 88% em 24 h.

Após esse ensaio, foi feito um estudo de reutilização do SFBL durante 6 ciclos contínuos de síntese, com duração de 48 h cada. A conversão de 91% obtida no primeiro ciclo diminuiu para 86% no segundo e chegou ao final do sexto ciclo em 51%, com um total de 288 h de uso do SFBL (Figura 20).

Em comparação com o estudo de reutilização do SFBL também realizado neste trabalho (seção 5.4.3), os resultados obtidos com o uso do reservatório de meio reacional com barreira física para remoção de água foram

melhores. Apesar de não se manter nos ciclos seguintes, a conversão de 91% obtida no primeiro ciclo, SFBL pode ser reutilizado por um maior período de tempo (288 h) do que o anteriormente alcançado (240 h), com uma conversão razoável (acima de 50%).

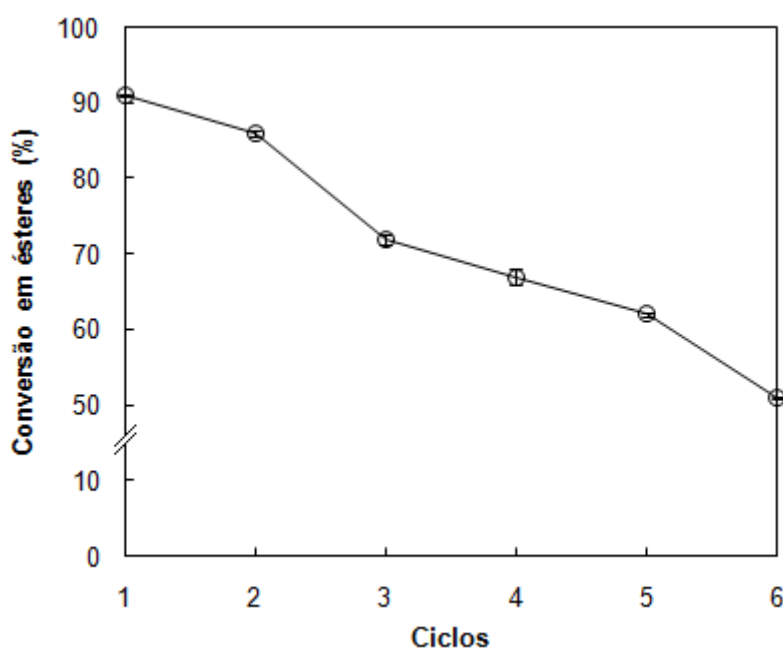


FIGURA 20 - REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO NA ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO EM SÉRIE

Conversão absoluta para cada ciclo de síntese de 48 h: (○). Condições das reações: 120 g de sólido fermentado (base seca), 245 g de etanol e 1000 g de oleína, (RM 1,5:1), vazão de circulação 5 mL min<sup>-1</sup>, 45°C. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média. Quando a barra de erro não é visível, é menor do que o símbolo.

A produção de éster em cada ciclo da reação de esterificação foi calculada a partir da conversão obtida. No primeiro ciclo foi produzido 1 kg de ésteres e, até o sexto ciclo, foram acumulados 4,7 kg de ésteres, com apenas 120 g de SFBL. A reutilização possibilitou o aumento da produção de éster por g de SFBL. Por exemplo, no primeiro ciclo da reação, foram produzidos 8 g de ésteres por g de SFBL ( $\text{g}_{\text{éster}} \text{g}^{-1}\text{SS}$ ) e com as sucessivas reutilizações de SFBL foi possível produzir 39  $\text{g}_{\text{éster}} \text{g}^{-1}\text{SS}$  até o sexto ciclo.

## 5.7 DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, aumentou-se em dez vezes a escala do processo desenvolvido por Soares et al. (2013), utilizando um reator com três colunas em série com um reservatório de meio reacional onde a fase aquosa produzida na esterificação foi removida por barreira física, ao mesmo tempo em que a fase orgânica foi agitada, obtendo-se 88% de conversão em 24 h da reação. A conversão foi reduzida em 4% quando comparada com a obtida por Soares et al. (2013), que relataram 92% de conversão em 31 h. Contudo, o tempo da reação foi diminuído em 7 h, proporcionando um maior valor de produtividade que passou de 272 para 336 mg g<sup>-1</sup>SS h<sup>-1</sup>. Este foi o maior valor de produtividade relatado até o momento para produção de ésteres do biodiesel com aplicação direta de sólidos fermentados (Tabela 5).

Com 88% de ésteres na amostra, chegou-se próximo ao teor mínimo exigido pela especificação que é de 96,5% de ésteres (m m<sup>-1</sup>) para que o produto final do processo de esterificação seja aceito como biodiesel (Resolução ANP N° 45, de 25 de agosto de 2014). Como alternativa para melhorar o sistema e satisfazer a especificação, processos de purificação do biodiesel podem ser aplicados, pela inclusão de um reator pós-reação para remover os ácidos graxos livres residuais. Com esta finalidade, três materiais já foram utilizados: cinzas de casca de arroz, sílica gel e bentonita. As cinzas da casca do arroz, obtidas através da combustão da casca do arroz, foram eficientes na sorção dos ácidos oleico, láurico, mirístico e esteárico (PROCTOR; ADHIKARI; BLYHOLDER, 1995; SALEH; ADAM, 1994). Já a sílica gel mostrou-se melhor para purificar uma mistura de ésteres do biodiesel, por sorção de AGLs, com uma menor perda de ésteres quando comparada com as cinzas da casca do arroz (ÖZGÜL-YÜCEL; TURKAY, 2003). A bentonita também pode ser uma boa alternativa para a remoção de AGLs. A sua aplicação foi eficiente na purificação de matérias-primas com altos teores de AGLs para a síntese de biodiesel (BERRIOS et al., 2011).

TABELA 5 - ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES DO BIODIESEL COM APLICAÇÃO DIRETA DE SÓLIDOS FERMENTADOS

	Fonte de lipases	Sólido Fermentado	Ácido graxo/álcool <sup>1</sup> (RM)	Solvente	Reator	Conversão/ Tempo Produtividade <sup>2</sup> (mg g <sup>-1</sup> SS h <sup>-1</sup> )	Referência
ESTERIFICAÇÃO	<i>Burkholderia lata</i> CPQBA 515-12 DRM 01	<sup>3</sup> (BC + FSG)	Oleína/Etanol (1,5:1)	Ausência	Leito fixo	88%/ 24h (336)	Este Trabalho
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	<sup>4</sup> (BC + nutrientes)	<sup>5</sup> AGBS/Etanol (10:1)	Ausência	Leito fixo	58%/ 48 h (60)	Botton (2014)
	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	<sup>4</sup> (BC + nutrientes)	<sup>5</sup> AGBS/Etanol (10:1)	Ausência	Frascos agitados	86%/ 48 h (102)	Botton (2014)
	<i>Burkholderia lata</i> CPQBA 515-12 DRM 01	<sup>3</sup> (BC + FSG)	<sup>5</sup> AGBS/Etanol (3:1)	Ausência	Leito fixo	92%/ 31 h (272)	Soares et al. (2013)
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<sup>3</sup> (BC + FSG)	Óleo de soja/ Etanol (4,3:1)	<i>tert</i> -butanol	Frascos agitados	91%/96 h (87)	Liu et al. (2014)
TRANSESTERIFICAÇÃO	<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	<sup>4</sup> (BC + nutrientes)	Óleo de milho/ Etanol (3:1)	Ausência	Frascos agitados	68%/72 h (64)	Zago et al. (2014)
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<sup>3</sup> (BC + FSG)	Óleo de soja / Etanol (4:1)	<i>tert</i> -butanol	Frascos agitados	86%/96 h (82)	Liu et al. (2013)
	<i>Burkholderia lata</i> CPQBA 515-12 DRM 01	<sup>3</sup> (BC + FSG)	Óleo de soja / Etanol (3:1)	Ausência	Leito fixo	95%/46 h (152)	Salum et al. (2010)

<sup>1</sup>RM: razão molar (álcool:ácido graxo); <sup>2</sup>Produtividade (mg de éster produzido em 1 h, por 1 g de catalisador): foi calculada a partir dos dados de conversão relatados nos trabalhos; <sup>3</sup>(BC+FSG): Mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol; <sup>4</sup>(BC + nutrientes): Mistura de bagaço de cana e solução nutriente; <sup>5</sup>AGBS: Ácidos graxos da borra de soja.

O valor teórico da conversão em equilíbrio, calculado por modelo termodinâmico, para um sistema reacional que contém ácido oleico, etanol, oleato de etila e água, na razão molar 1,5:1 (etanol:AGLs) é de 80% (Anexo). Esse valor foi obtido para o ácido oleico puro e, provavelmente também se aplica a outras misturas de ácidos graxos, uma vez que Soares (2014) obteve conversões experimentais iguais para a mistura AGBS e para ácido oleico puro. Assim, pode-se concluir que o valor de conversão da oleína em ésteres, obtidos em 24 h (88%), está acima do valor estimado pelo modelo termodinâmico. Esta conversão foi possível através da remoção da água formada durante a reação, tanto pela sorção no SFBL quanto pela separação da fase aquosa, feita no reservatório de meio reacional com barreira física para remoção de água.

O efeito da remoção da fase aquosa na esterificação já foi estudado por vários autores que adicionaram diferentes compostos no meio de reação para este fim: peneira molecular (BOTTON, 2014; MENG et al., 2011), glicerol (WANTANABE et al., 2007) e água (SOARES, 2014; ATADASHI et al., 2012; FORESTI et al., 2007). Todavia, a utilização de um reservatório com barreira física é mais simples e mais barata do que os métodos já estudados e ainda, ao final do processo, evita-se etapas extras de separação da fase orgânica, pois a fase aquosa foi naturalmente decantada em um compartimento separado. O uso desse reservatório de meio reacional favoreceu o aumento da velocidade inicial da reação e elevou a conversão em ésteres em reatores de leito fixo. Além disso, a fase orgânica tornou-se homogênea e, desta maneira, a análise das amostras coletadas refletiu a conversão real em ésteres, o que trouxe mais confiabilidade ao processo.

Como já mencionado, a aplicação direta de sólidos fermentados na síntese de ésteres do biodiesel é uma técnica vantajosa, pois dispensa etapas adicionais de recuperação e imobilização das lipases. Os resultados obtidos neste trabalho fazem uma importante contribuição para o desenvolvimento deste processo em escala piloto, pois mostraram que se pode fazer o aumento de escala do processo, com substratos diferentes, com conversões semelhantes, principalmente tendo em vista que comportamentos observados em processos otimizados em pequena escala dificilmente serão reproduzidos com a mesma eficiência em escala maior (BISIO; KABEL, 1985).

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, aumentou-se em dez vezes a escala do processo desenvolvido por Soares et al. (2013). Foi utilizado um reator de leito fixo com três colunas em série preenchidas com 120 g de SFBL e 1245 g de meio reacional foram circulados pelas colunas. As condições da reação foram: 245 g de etanol e 1000 g de oleína (RM 1,5:1), circulação da fase orgânica a uma vazão de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , a  $45^\circ\text{C}$ . Obteve-se 88% de conversão em ésteres em 24 h e a produtividade do sistema chegou a  $336 \text{ mg g}^{-1}\text{SS h}^{-1}$ . O sistema foi operado por 6 ciclos consecutivos de síntese (288 h) com manutenção da conversão acima de 50%. No primeiro ciclo foi produzido 1 kg de ésteres e, até o sexto ciclo, foram acumulados 4,7 kg de ésteres, o que é equivalente a uma produção de 39 g de éster por g de sólido fermentado.

O uso de um reservatório de meio reacional onde a fase aquosa produzida na esterificação foi removida por barreira física, ao mesmo tempo em que a fase orgânica foi agitada, proporcionou o aumento da conversão, favoreceu o aumento da velocidade inicial da reação e tornou a fase orgânica homogênea, trazendo mais confiabilidade aos resultados relatados.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que é possível fazer o escalonamento de processos de síntese enzimática do biodiesel utilizando biorreatores de leito fixo preenchidos com sólidos fermentados e poderão auxiliar na implantação industrial deste processo.

## 7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas perspectivas para trabalhos futuros, tais como: (1) estudos que tenham como objetivo o aumento da estabilidade da atividade lipolítica do sólido fermentado no meio reacional, para possibilitar a síntese em modo contínuo. As lipases de *B. lata* são extracelulares e ficam imobilizadas no sólido por adsorção, por interação hidrofóbica ou hidrofílica e também podem ficar na parede celular, que é hidrofóbica. Para aumentar a estabilidade das lipases no sólido fermentado, recomenda-se o estudo de métodos de imobilização das lipases por ligação covalente, pós-fermentação, mediante tratamentos com agentes promotores de ligações covalentes cruzadas, como é o caso do glutaraldeído e da polietileneimina (YÜCEL, 2011; SUN et al., 2010b; MIGNEAULT et al., 2004). Com a ligação covalente entre as lipases e o sólido, também há possibilidade de aumentar a reutilização das lipases, elevando a produtividade do processo; (2) estudos de síntese de ésteres do biodiesel com matérias-primas que sejam subprodutos industriais ou comerciais, como misturas de ácidos graxos livres obtidas por hidrólise de gorduras de baixo custo. Podem-se utilizar, por exemplo, borras ácidas oriundas do refino de óleos vegetais, sebo de graxaria e óleo residual proveniente de caixa de gordura. A oleína bidestilada utilizada neste trabalho, serviu apenas como substrato modelo. O seu uso para produção de biodiesel em larga escala é inviável posto que a oleína tem aplicações mais nobres na indústria; (3) estudos de desenvolvimento de metodologias de purificação do biodiesel. Para isso, pode-se implantar uma unidade operacional pós-reação com o intuito de remover os ácidos graxos livres residuais. Isso pode ser feito através da sorção com cinzas da casaca do arroz, sílica gel ou bentonita, como já descrito na literatura, ou verificar a possibilidade da aplicação de outros materiais; (4) estudos da viabilidade econômica do processo, incluindo custos da FES, da matéria-prima, da esterificação em reator de leito fixo, da purificação do biodiesel e da recuperação e reciclo do etanol. Com esses estudos, pode-se comparar o custo de processo enzimático com o químico, sendo que, para a catálise

química, deve-se levar em conta os custos com o tratamento dos efluentes alcalinos gerados a partir das lavagens do produto final.



## 8. REFERÊNCIAS

ABIGOR, R.D.; UADIA, P.O.; FOGLIA, T.A.; HAAS, M.J.; JONES, K.C.; OKPEFA, E.; OBIBUZOR, J.U.; BAFOR, M.E. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. **Biochemistry Society Transactions**, v. 28, p. 979-981, 2000.

ADACHI, D.; HAMA, S.; NAKASHIMA, K.; BOGAKI, T.; OGINO, C.; KONDO, A. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 410-416, 2013.

AGUIEIRAS, E.C.G.; CAVALCANTI, E.D.C.; CASTRO, A.M.; LANGONE, M.A.P.; FREIRE, D.M.G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

AL-ZUHAIR, S.; LIG, F.W.; JUN, L.S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p.951-960, 2007.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Ca 5a-40), 4 ed, Champaign, 1989.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Cd 3-25), 4 ed, Champaign, 1990.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Cd 1-25), 4 ed, Champaign, 1995.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Ce 1-62), 4 ed, Champaign, 1997.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Ca 2e-84), 4 ed, Champaign, 1997.

ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 14/12/2014.

ATADASHI, I.M.; AROUA, M.K.; ABDUL, A.A.R.; SULAIMAN, N.M.N. The effects of water on biodiesel production and refining technologies: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3456-3470, 2012.

AZÓCAR, L.; CIUDAD, G.; HEIPIEPER, H.J.; NAVIA, R. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.88, p. 621-636, 2010.

BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production: a review of current work. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 1479-1492, 2011.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.

BANKOVIĆ-ILIĆ, I.B.; STAMENKOVIĆ, O.S.; VELJKOVIĆ, V.B. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3621-3647, 2012.

BARON, A.M.; BAROUTH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **Fuel**, v. 117 (part A), p. 458-462, 2014.

BARON, A.M.; ZAGO E.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, p. 19-24, 2011.

BERRIOS, M.; MARTÍN, M.A.; CHICA, A.F.; MARTÍN, A. Purification of biodiesel from used cooking oils. **Applied Energy**, v. 88, p. 3625-3631, 2011.

BISIO, A.; KABEL, R.L. **Scale up of Chemical Processes: Conversion from Laboratory Scale Tests to Successful Commercial Size Design**. New York: Wiley Interscience Publication, 1985.

BORGES, M.E.; DIAZ, L.; Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2839-2849, 2012.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.

BOTTON, V. **Síntese de ésteres etílicos catalisada pela adição direta de sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM em sistema livre de solventes**. Curitiba, 136p. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

BRASIL, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e B combustíveis – ANP: Resolução n. 14, de 11 de maio de 2012. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270 de 22 de setembro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 de set. 2005.

CANACKI, M.; GERPEN, J.V. Biodiesel production via acid catalysis. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v. 42, p. 1203-1210, 1999.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D.; SILVA, P.R.; RAMOS, A.P.; ARANDA, D.A.G.; FREIRE, D.M.G. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p.1-8, 2010.

CHEN, H.C.; JU, H.Y.; WU, T.T.; LIU, Y.C.; LEE, C.C.; CHANG, C.; CHUNG, Y. L.; SHIEH, C.J. Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

CHRISTOPHER, L.P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V.P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v.119, p. 497-520, 2014.

CORDEIRO, C.S.; SILVA, F.R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L.P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, p. 477-486, 2011.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 291-302, 2006.

CVENGROS, J.; CVENGROSOVÁ, Z.; Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, p. 173-181, 2004.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 3-27, 1997.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 194-200, 1999.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 117-124, 2002.

EUROPEAN STANDARD (EN). Fat and oil derivatives, fatty acid methyl esters, determination of ester and linolenic acid methyl ester contents (EN 14103), CEN, European Committee for Standardization, 2003.

EUROPEAN STANDARD (EN). Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications - Requirements and test methods (EN 14214), CEN, European Committee for Standardization, 2003.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**, 6 ed, Springer: Berlin, 2011.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Curitiba, 120 p. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FOMUSO, L. B.; CORREDIG, M.; AKOH, C. C. Metal-catalyzed oxidation of a structured lipid model emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7114-7119, 2002.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Frequent analytical/experimental problems in lipase-mediated synthesis in solvent-free systems and how to avoid them. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1408-1425, 2005.

FORESTI, M.L.; PERDENERA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M.L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62-70, 2007.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, O.R.; PRYDE, H.E. Transesterification Kinetics of Soybean Oil. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 63, n. 10, 1986.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H.; MOUNTS, T.L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, p. 1638-1643, 1984.

GIAKOUMIS, E.G. A statistical investigation of biodiesel physical and chemical properties, and their correlation with the degree of unsaturation: a review. **Renewable Energy**, v. 50, p. 858-878, 2013.

GOMBERT, A.K.; PINTO, A.L., CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 85-90, 1999.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA T.; PERMAUL, K.; BUX F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p.763-781, 2004.

HAAS, M.J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1087-1096, 2005.

HAAS, M.J.; BLOOMER, S.; SCOTT, K. Simple, high-efficiency synthesis of fatty acid methyl esters from soapstock. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, p. 373-379, 2000.

HAAS, M.J.; MICHALSKI, S.; RUNYON, S.; NUNEZ, A.; SCOTT, K.M. Production of FAME from acid oil, a by-product of vegetable oil refining. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 80, p. 97-102, 2003.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p.188-194, 2009.

HALIM, S.F.A.; KAMARUDDIN, A.H.; FERNANDO, W.J.N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 710-716, 2009.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386-395, 2013.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10419-10424, 2011.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 273-278, 2007.

HARDING, K.G.; DENNIS J. S.; VONBLOTTNITZ, H.; HARRISON, S. T. L. A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. **Journal of Cleaner Production**, v. 16, p. 1368–1378, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C. Enzyme reactors. In: ILLANES, A. **Enzyme biocatalysis principles and application**. Springer Netherlands, p. 205-251, 2008.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, 2001.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JEGANNATHAN, K.R.; ENG-SENG, C.; RAVINDRA, P. Economic assessment of biodiesel production: comparison of alkali and biocatalyst processes. **Renewable and Sustainable Sustain Energy**, v.15, p. 745–751, 2011.

JENSEN, R.G.; GALLUZZO, D.R.; BUSH, V.J. Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 3, p. 307-316, 1990.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 12-15, 2001.

KODA, R.; NUMATA, T.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NAKASHIMA, K.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Ethanolysis of rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by *Fusarium heterosporum* lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 101-104, 2010.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; DE LIMA, V. M.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. **Catalysis Reviews-Science and Engineering**, v. 44, p. 499-591, 2002.

LANE, J. **Biodiesel 2.0- the next chapter for America's favorite advanced biofuel**. Disponível em: <<http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/01/20/biodiesel-2-0-the-next-chapter-for-americas-favorite-advanced-biofuel/>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2014.

LAUDANI, C.G.; HABULIN, M.; KNEZ, Z.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p. 74-81, 2007.

LEAL, M.C.C.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal Chemical Engineer**, v. 19 (2), 2002.

LI, A.; NGO, T.P.N.; YAN, J.; TIAN, K.; LI, Z. Whole-cell based solvent-free system for one-pot production of biodiesel from waste grease. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 725-729, 2012.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004.

LIU, C.H.; HUANG, C.C.; WANG, Y.W.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by Burkholderia lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v. 100, p. 41-46, 2012.



LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 303-309, 2013.

LIU, Y.; LI, C.; WANG, S.; CHEN, W. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and Kinetics. **Applied Energy**, v. 113, p. 713-721, 2014.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MACEIRAS, R.; VEGA, M.; COSTA, C.; RAMOS, P.; MARQUEZ, M. C. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. **Fuel**, v.88, n. 11, p. 2130-2134, 2009.

MADALOZZO, A.D.; MUNIZ, L.S.; BARON, A.M.; PIOVAN, L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 13-19, 2014.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1539–1551, 2008.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, v. 89, p. 740-748, 2008.

MARTINEZ-RUIZ, A.; GARCIA, H.S.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 393-401, 2008.

MATH, M.C.; KUMAR, S.P.; CHETTY, S.V. Technologies for biodiesel production from used cooking oil: A review. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, p. 339-345, 2010.

MEHER, D.L.C.; SAGAR, V.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268, 2006.

MENG, Y.; WANG, G.; YANG, N.; ZHOU, Z.; JUAN, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1-9, 2011.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor step of SSF: A complex interaction of phenomena**. In: MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Springer, p. 13-32, Heidelberg, 2006.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of Solid State Bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

MOURE, V. R.; FABRÍCIO, C.; FRENSCH, G.; MARQUES, F. A.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013 (*in press*).

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.

ÖZGÜL-YÜCEL, S.; TÜRKAY, S. Purification of FAME by rice hull ash adsorption. **Journal Of The American Oil Chemists Society**, v. 80, p. 373–376, 2003.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PARKE, J.L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, p. 225-258, 2001.

PERRY, R.H.; CHILTON, C.H. **Chemical Engineers' handbook**. Tokyo: McGraw-Hill, 5ed., 1973.

PHAN, A.N.; PHAN, T. M. Biodiesel production from waste cooking oils. **Fuel**, v. 87, p. 3490- 3496., 2008.

PORTHA J.F.; ALLAIN F.; COUPARD, V.; DANDEU, A.; GIROT, E.; SCHAER, E.; FALK, L. Simulation and kinetic study of transesterification of triolein to biodiesel using modular reactors. **Chemical Engineering journal**, v. 207-208, p. 285-298, 2012.

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.

PRIEBE, G. P. S. **Avaliação das condições operacionais da produção de oleína obtida a partir de tecido subcutâneo de peles bovinas**. Porto Alegre, 137 p. Dissertação (mestrado em engenharia) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

PROCTOR, A.; ADHIKARA, C.; BLYHOLDER, G.D. Mode of Oleic Acid Adsorption on Rice Hull Ash Cristobalite, **Journal Of The American Oil Chemists Society**, v. 72, p. 331–335, 1995.

QIN, H.; YAN, X; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, p. 41-46, 2008.

RAMOS, L.P.; KUCEK, K.T.; DOMINGOS, A.K.; WILHELM, H. M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.

RODRIGUES, R.C.; PESSELA, B.C.C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M.; AYUB, M.A.Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1268-1273, 2010.

SALEH, M.I.; ADAM, F. Adsorption Isotherms of Fatty Acids on Rice Hull Ash in a Model System, **Journal Of The American Oil Chemists Society**, v. 71, p. 1363–1366, 1994.

SALIHU, A.; ZAHANGIR, A.M.; ABDULKARIM, M.I.; SALLEH, H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues: A Review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SALUM, T.F.C. **Produção e imobilização de lipases para utilização em síntese de ésteres**. Curitiba, 167 p. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SALUM, T.F.C.; BARON, A.M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, p. 197-203, 2008.

SALUM, T.F.C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C.I.; COCCO, L.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARIN, R.; SHARMA, M.; SINHARAY, S.; MALHOTRA, R. Jatropha–palm biodiesel blends: an optimum mix for Asia. **Fuel**, v.86, p. 1365-1371, 2007.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199-210, 1998.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SOARES, D. **Desenvolvimento do processo de esterificação etílica enzimática de ácidos graxos em reator de leito fixo**. Curitiba, 156 p. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

SOARES, D.; PINTO, A.F.; GONÇALVES, A.G.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15-23, 2013.

SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI S.M.P.; MENEGHETTI M.R.; WOLF C.R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, p. 667-676, 2007.

SUN, T.; DU, W.; ZENG, J.; DAI, L.; LIU, D. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 514-518, 2010a.

SUN, T.; DU, W.; LIU, D.; DAI, L. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1192–1195, 2010b.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TAN, T.; SHANG, F.; ZHANG, X. Current development of biorefinery in China. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 543-555, 2010.

TEPE, O.; DURSUN, A. Y. Combined effects of external mass transfer and biodegradation rates on removal of phenol by immobilized *Ralstonia eutropha* in a packed bed reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 9–16, 2008.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, p. 36-43, 2001.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.67, p.52-59, 2010.

TRAN, A.D.T.; LIN, B.Y.J.; CHEN, A.C.L.; CHANG, J.S. Modeling the methanolysis of triglyceride catalyzed by immobilized lipase in a continuous-flow packed-bed reactor. **Applied Energy**, v. 126, p.151-160, 2014.

TRENTIN, C.M.; SCHERER, R.P.; ROSA, R.D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, V.J. Continuous lipase-catalyzed esterification of soybean fatty acids under ultrasound irradiation. **Bioprocess Biosyst**, v.37, p. 841-847, 2013.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 716–722, 2007.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J.J.; MAHENTHIRALINGAM, E., SPEERT, D.P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species: *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **Reading**, v. 59, p. 102-111, 2009.

VENY, H.; AROUA, M.K.; SULAIMAN, N.M. N.Kinetic study of lipase catalyzed transesterification of jatropha oil in circulated batch packed bed reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 237, p. 123-130, 2014.

VÉRAS, I.C.; SILVA, F.A.L.; FERRÃO-GONZALES, A.D.; MOREAU, V.H. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9653-9658, 2011.

WANG, X. Q.; LIU, X; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6352-6355, 2011.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous Production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, p. 355-360, 2000.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 703-707, 2001.

YAAKOB, Z.; MOHAMMAD, M.; ALHERBAWI, M.; ALAM, Z.; SOPIAN, K. Overview of the production of biodiesel from Waste cooking oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.18, p.184-193, 2013.

YADAV, G.D.; DEVI, K.M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 373-383, 2004.

YAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614-1631, 2014.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095-2103, 2005.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 76-80, 2012.

YÜCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3977–3980, 2011.

ZAGO, E.C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 127 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ZAGO, E.; BOTTON, V.; ALBERTON, D.; CORDOVA, J.; AMAMOTO, C.I.; CCO, L.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. **Energy Fuels**, v. 28, p. 5197-5203, 2014.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M.; MCLEAN, D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 1-16, 2003.

ZHONG, H.; FANG, Z.; ZOU, B.; LI, X.; OUYANGA, P.; GUO, K. Studies on the lipase-catalyzed esterification of alkyl oleates in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 114-117, 2013.



## ANEXO

## CÁLCULOS DE EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

Com o objetivo de analisar a conversão de equilíbrio experimental, cálculos termodinâmicos foram realizados para a determinação dos valores teóricos das conversões de equilíbrio nas condições utilizadas neste estudo. Os cálculos termodinâmicos foram gentilmente realizados pelo Prof. Luiz Fernando de Lima Luz Junior do Departamento de Engenharia Química da UFPR (TABELA 1).

TABELA 1 - DADOS TEÓRICOS DAS CONVERSÕES DE EQUILÍBRIO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO (ETANOL+ ÁCIDO OLEICO) ESTIMADAS POR MODELO TERMODINÂMICO

Razão molar (etanol:AGL)	Conversão de equilíbrio estimadas	Razão molar (etanol:AGL)	Conversão de equilíbrio estimadas
1,5:1	80%	5:1	94%
3:1	88%	10:1	97%
4:1	93%	12:1	97%

Resumidamente, o equilíbrio da reação foi calculado considerando uma mistura não ideal em fase líquida. A não idealidade da fase líquida foi corrigida utilizando o modelo de contribuição de grupo UNIFAC – LL para os cálculos dos coeficientes de atividade (MAGNUNSEN; RASMUSSEN; FREDENSLUND, 1981). Durante os cálculos do equilíbrio, um teste de estabilidade de fases, baseado no critério do plano tangente de Gibbs, foi realizado para testar a estabilidade da fase líquida. O teste de estabilidade de fases utilizado neste trabalho foi o mesmo apresentado por Ferrari et al. (2009). Quando uma instabilidade da fase líquida foi encontrada, então um cálculo de separação da fase foi realizado, sendo considerada a fase orgânica como a

fase reagente. O mesmo comportamento foi obtido por Voll et al. (2011) e resultados semelhantes foram observados. Para os cálculos do equilíbrio, foi utilizado o ácido oleico como um sistema modelo, e os parâmetros termodinâmicos dos componentes puros foram obtidos da literatura (Tabela 2).

TABELA 2 - PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS DOS COMPONENTES PUROS

Componente	$\Delta G_{f,0}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{f,0}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{vap,0}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Ácido Oleico	-189,7 <sup>a</sup>	-710,2 <sup>b</sup>	110,69 <sup>b</sup>
Oleato de etila	-136,2 <sup>c</sup>	-695,1 <sup>a</sup>	87,61 <sup>b</sup>
Etanol	-167,8 <sup>b</sup>	-235,1 <sup>b</sup>	42,6 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O	-228,6 <sup>b</sup>	-241,8 <sup>b</sup>	44,0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Voll et al. (2011); <sup>b</sup> DIPPR; <sup>c</sup> Bucalá et al. (2006). Estado gasoso, gás ideal, 25°C, 1 atm.

## REFERÊNCIAS

BUCALÁ, V.; FORESTI, M. L.; TRUBIANO, G.; FERREIRA, M. L.; BRIOZZO, M.; BOTTINI, S. Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 914-920, 2006.



FERRARI, J.C.; NAGATANI, G.; CORAZZA, F.C.; OLIVEIRA, J.V.; CORAZZA, M.L. Application of stochastic algorithms for parameter estimation in the liquid-liquid phase equilibrium modeling. **Fluid Phase Equilibria**, v. 280, p. 110-119, 2009.

MAGNUNSEN, T.; RASMUSSEN, P.; FREDENSLUND, A. UNIFAC parameter table for prediction of liquid-liquid equilibria. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 20, p. 331-339, 1981.

VOLL, F. A. P.; SILVA, C.; ROSSI, C. C. R. S.; GUIRARDELLO, R.; CASTILHOS, F.; OLIVEIRA, V.; CARDOZO-FILHO, L. Thermodynamic analysis of fatty acid esterification for fatty acid alkyl esters production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 781-788, 2011.

## APÊNDICES

### A. IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA *Burkholderia lata*

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS <b>RELATÓRIO TÉCNICO</b>	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
	NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM	
		PÁGINA: 2 de 8

#### I. Identificação de Bactérias

##### 1. Objetivos

- Identificação molecular de uma linhagem bacteriana utilizando sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S.

##### 2. Amostra recebida

REGISTRO	AMOSTRA
CPQBA 515-12 DRM 01	Lteb11

##### 3. Metodologia utilizada

- Amplificação do gene RNA ribossomal 16S.** A metodologia consistiu na amplificação do gene RNA ribossomal 16S pela técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da cultura, segundo protocolo descrito por Van Soolinger *et al.* (1993). Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram p10f e p1100r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.
- Sequenciamento.** Os produtos das amplificações foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram o 10f e o 1100r.
- Análise filogenética.** As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Foram então selecionadas sequências de micro-organismos relacionados ao micro-organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 reamostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 4.0.

##### 4. Resultados

- As colônias isoladas obtidas em cultivo apresentaram aspecto homogêneo, sem evidências de contaminação. A análise microscópica da coloração de Gram está apresentada abaixo:



REGISTRO	Análise
CPQBA 515-12 DRM 01	Bastonetes gram negativos

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

 <b>UNICAMP</b> FMQ-07 Emissão: GGQ	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS <b>RELATÓRIO TÉCNICO</b>	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4	
	<table border="1"> <tr> <td>NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM</td> <td>PÁGINA: 3 de 8</td> </tr> </table>		NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM	PÁGINA: 3 de 8		

- Os fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. Os produtos das amplificações foram purificados em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento usando o sistema ABI3500XL Series (Applied Biosystem).
- A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S obtidas para a amostra **CPQBA 515-12 DRM 01** está apresentada no Anexo I.
- A árvore filogenética construída a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e da amostra **CPQBA 515-12 DRM 01** está apresentada na Figura 1.

- Os resultados de identificação são apresentados abaixo:

REGISTRO	AMOSTRA RECEBIDA	IDENTIFICAÇÃO
CPQBA 515-12 DRM 01	Lteb11	<i>Burkholderia lata</i> Vanlaere et al. 2009

#### 5. Comentários

- A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra **CPQBA 515-12 DRM 01** apresentou 100% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de várias linhagens de *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia lata* e *Burkholderia arboris*, além de similaridade com sequências de várias linhagens de *Burkholderia* sp. contidas nas bases de dados consultadas Genbank e RDP.

A análise filogenética (Figura 1) recuperou a amostra **CPQBA 515-12 DRM 01** em um agrupamento coeso com linhagens de *Burkholderia lata*, incluindo a linhagem tipo da espécie, permitindo definir a identificação da amostra em nível de espécie.

#### 6. Referências Bibliográficas



- Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- Van Soolinger D., De Haas Pw., Hermans Pwm, Groenen P., Van Embden Jda., 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetics markers for strain differentiation and epidemiology of M. tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 31:1987-95.

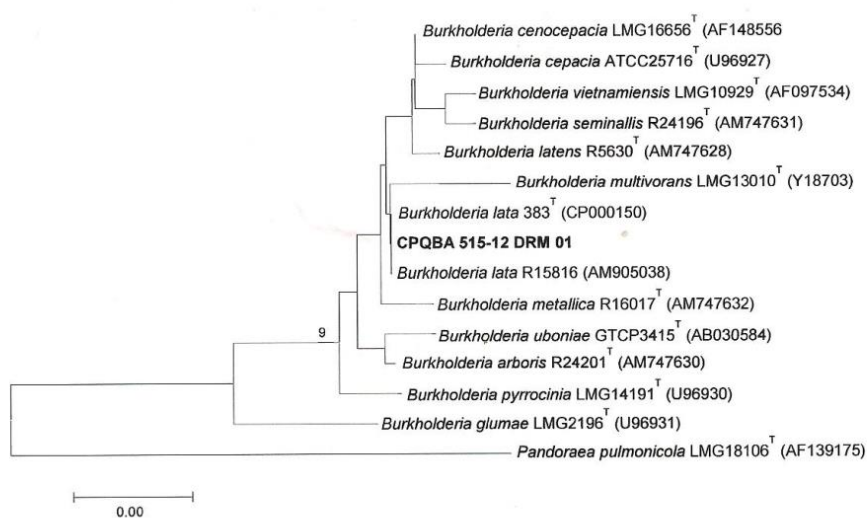
Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS <b>RELATÓRIO TÉCNICO</b>	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM		PÁGINA: 4 de 8



**Figura 1.** Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra **CPQBA 515-12 DRM 01** e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e Genbank.



Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS <b>RELATÓRIO TÉCNICO</b>	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 515/12 DRM		PÁGINA: 8 de 8

**Anexo I.** Sequências parciais do RNAr 16S da amostra de bactéria e da região ITS do operon ribossomal da amostra de fungo analisada.

>CPQBA 515-12 DRM 01  
 CGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTAT  
 AGGGTTGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCTTACCAAGCGACGATC  
 AGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA  
 CGGGAGGCGAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCG  
 TGTGTGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGCTCT  
 AATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
 CCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAG  
 GCGGTTTGCTAAGACCGATGTAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGGTGACT  
 GGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGA  
 GATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCAC  
 GAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCA  
 ACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTG  
 GGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGCAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGG  
 ATGATGTGGATTAATT



>CPQBA 515-12 DRM 02  
 CTCATCAACCTGTGAACATACCTAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCCCGTAA  
 CACGGGCGCCCCCGCAGAGGACCCCTAATCTGTTTATATTATGTTTTCTGAGTAA  
 ACAAGCAAATAAATTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA  
 CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA  
 ACGCACATTGCGCCCCCAGTATCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCC  
 TCAGGCCCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAAGCCCCCTGTGGGCATACGCGCTC  
 CCCTAATACAGTGGCGGTCCCGCCGAGCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAA  
 CTGGAGAGCGGCGCGGCAAGCCGTAACCCCAACTTCTGAATGT

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

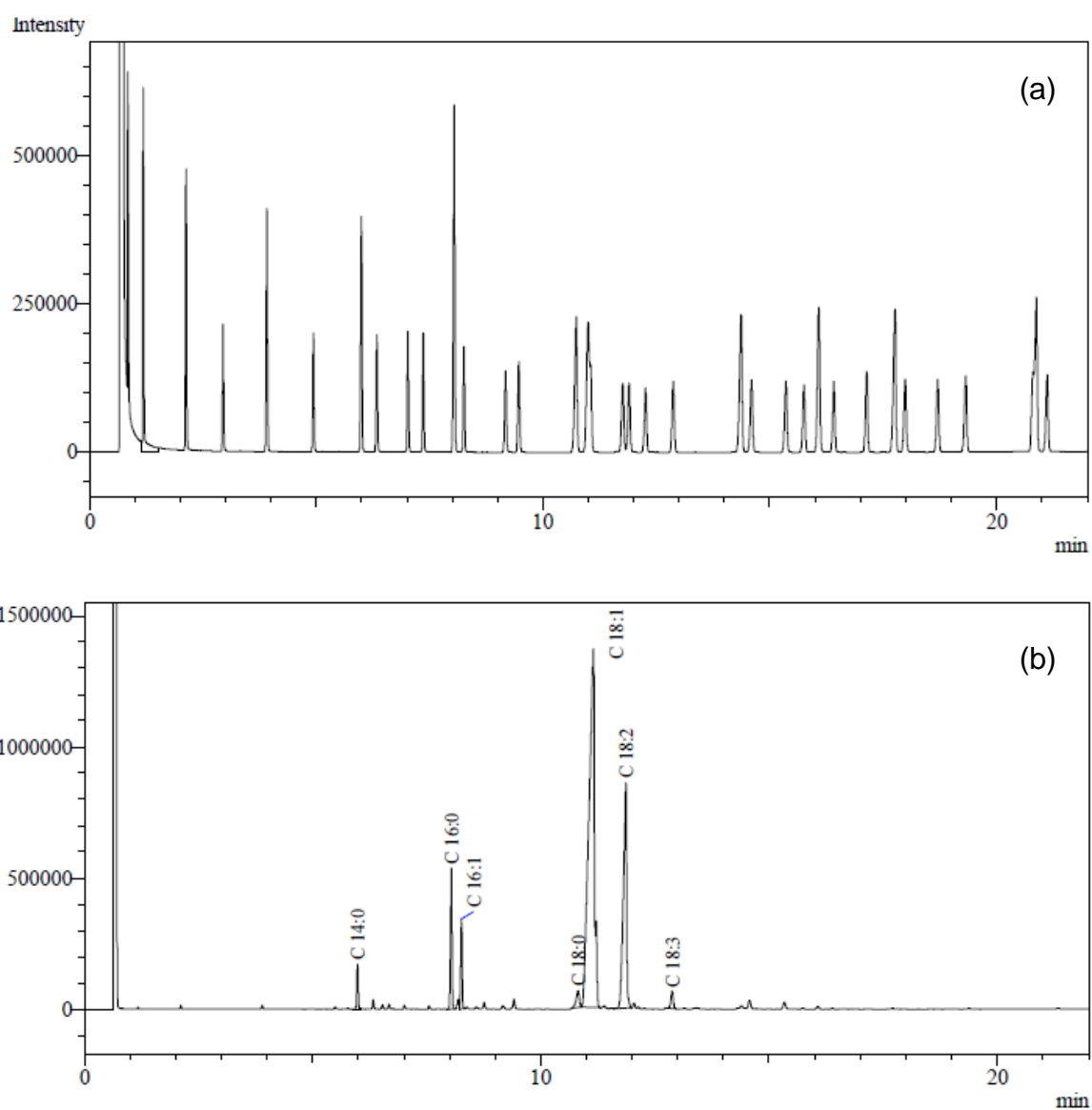
FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

Observação: o resultado referente à cepa *Burkholderia lata* CPQBA 515-12 DRM 01, utilizada neste trabalho, está indicado pela seta.

## B. CROMATOGRAMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA OLEÍNA BIDEDESTILADA

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos dos ésteres metílicos da amostra com os picos de uma mistura padrão de ésteres metílicos Mix FAME37. (a) padrão de ésteres metílicos Mix FAME37; (b) ésteres metílicos da oleína bidestillada.

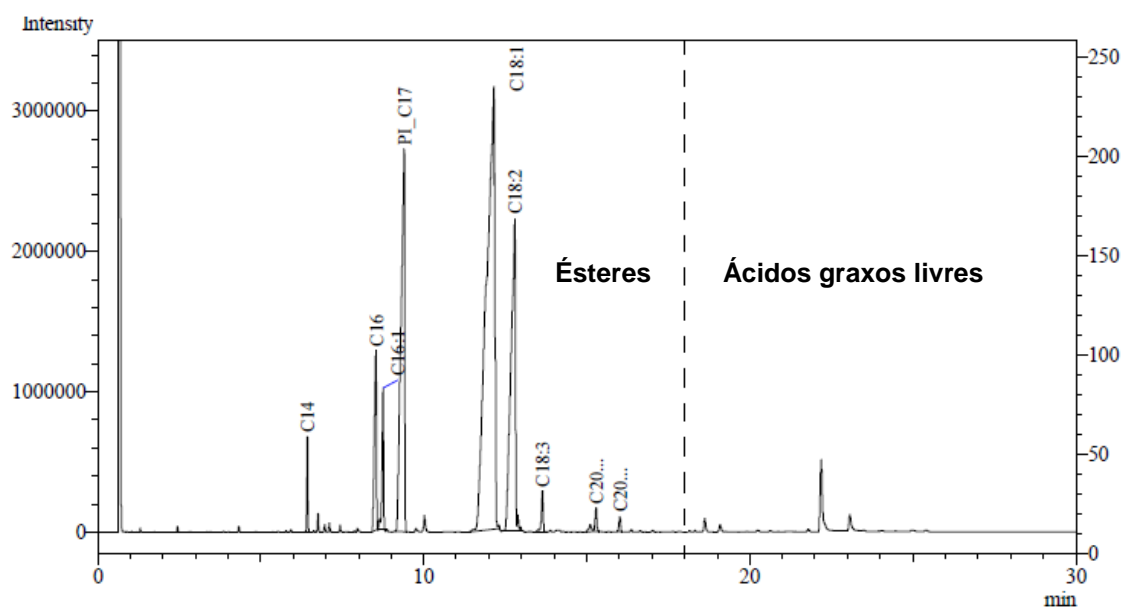


Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Cmpd Name
1	5,985	346876	1,825	%	C 14:0
2	8,042	1195620	6,290	%	C 16:0
3	8,262	740570	3,896	%	C 16:1
4	10,818	302313	1,590	%	C 18:0
5	11,153	11863199	62,411	%	C 18:1
6	11,864	4329721	22,778	%	C 18:2
7	12,879	229954	1,210	%	C 18:3
Total		19008253			



### C. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

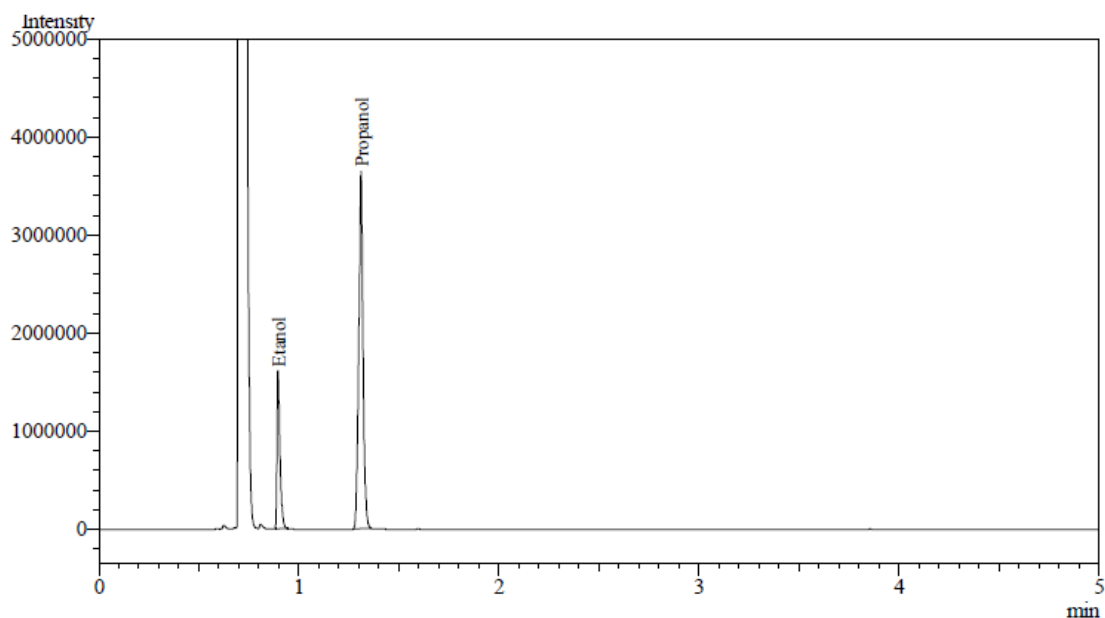
Cromatograma de uma determinação do teor de ésteres etílicos da reação de esterificação da oleína bidestilada



Peak#	Ret. Time	Area	Unit	Cmpd Name	Conc.
1	6,435	1491394	%	C14	1,358
2	8,537	5727825	%	C16	5,216
3	8,757	3307077	%	C16:1	3,012
4	9,401	20703408	%	PI_C17	18,854
5	12,153	55332031	%	C18:1	50,390
6	12,792	20826378	%	C18:2	18,966
7	13,644	1176194	%	C18:3	1,071
8	15,286	884024	%	C20...	0,805
9	16,017	360213	%	C20...	0,328
Total		109808544			

## D. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Cromatograma de uma determinação do teor de etanol



Peak#	Ret.Time	Area	Conc.	Unit	Cmpd Name
1	0,896	1681291	23,826	%	Etanol
2	1,311	5375395	76,174	%	Propanol
Total		7056686			